

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Mustapha Ben Boulaid-Batna 2
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة باتنة 2
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE DES ORGANISMES

Laboratoire Physio-Toxicologie, Pathologie Cellulaires et Moléculaires- Biomolécules

N°/SNV/2021

THÈSE

Présentée par

FEDALA ANFAL

Pour l'obtention du Diplôme de

DOCTORAT 3^E CYCLE

Filière: Sciences Biologiques

Spécialité: BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIO-TOXICOLOGIE

THÈME

L'EFFET DU CHROME HEXAVALENT SUR LA FONCTION
THYROÏDIENNE CHEZ LA RATE GESTANTE *ALBINOS Wistar*

Soutenue publiquement le 13/ 09 / 2021

DEVANT LE JURY

Président	SAIDI MAHDIA	Pr. Université de BATNA 2
Rapporteur	ADJROUD OUNASSA	Pr. Université de BATNA 2
Examineurs	BOUARROUDJ MOHAMED	Pr. Université de BATNA 2
	BENNOUNE OMAR	Pr. Université de BATNA 1
	SAFSAF BOUBKEUR	Pr. Université de BATNA 1

Année universitaire : 2020-2021

Résumé

Le chrome hexavalent (CrVI) est un métal lourd toxique et un polluant environnemental majeur suite à son bioaccumulation dans les écosystèmes, il exerce également des effets délétères dans plusieurs organes ainsi que des glandes endocrines dans l'organisme. Les objectifs de notre travail visent à déterminer l'effet toxique du chrome hexavalent sur la fonction thyroïdienne chez la rate gestante de la souche *Albinos Wistar* et d'évaluer à la fois les effets protecteurs de sélénium et zinc contre cette toxicité. Des rates gestantes *Albinos Wistar* ont été divisées en 7 groupes et traitées le 3^{ème} jour de la gestation, le premier groupe a reçu le NaCl 0.9 % et servi de témoin ; le 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} groupes ont été injectés par voie sous-cutanée de 10, 50 et 100 mg/ kg. Pc de $K_2Cr_2O_7$; les trois groupes restants ont reçu 10 mg/kg. Pc de $K_2Cr_2O_7$ en combinaison avec 0.3 mg/ kg. Pc de Se, 20 mg/ kg. Pc de $ZnCl_2$, ou avec les trois éléments simultanément. Le sang a été prélevé le 6^{ème} et le 20^{ème} jour ainsi que le sacrifice et prélèvement des tissus cibles ont été effectués le 20^{ème} jour. L'exposition au $K_2Cr_2O_7$ a provoqué une diminution de la croissance corporelle des rates et une augmentation des poids absolu et relatif thyroïdien. Les résultats obtenus ont indiqués que le $K_2Cr_2O_7$ a favorisé la bioaccumulation du Cr dans la thyroïde et induit une hypothyroïdie et des altérations histologiques, la peroxydation lipidique, la carbonylation protéique, l'augmentation des activités des enzymes anti-oxydantes et l'induction de l'apoptose, la fragmentation d'ADN et la formation des micronoyaux. La co-administration avec le Se et le $ZnCl_2$ a atténué la thyrotoxicité induite par le $K_2Cr_2O_7$ chez les rates gestante *Albinos Wistar* en présentant des effets chélatifs, antioxydants, anti-apoptotiques et génoprotecteurs. Cependant, le co-traitement simultané avec le Se et le $ZnCl_2$ à la fois a présenté des effets thyroprotecteurs moins prononcés, et par conséquent, des études supplémentaires sur l'interaction synergique du Se et du Zn contre la toxicité du CrVI en utilisant différentes doses et voies d'exposition sont recommandées.

Mots clés : Chrome hexavalent, Sélénium, Zinc, Thyrotoxicity, Génotoxicité, Stress oxydant, Rates gestantes

الملخص

الكروم سداسي التكافؤ (CrVI) هو معدن ثقيل سام، و يعد كملوث بيئي رئيسي بسبب تراكمه البيولوجي في النظم البيئية، كما أنه يسبب تأثيرات ضارة في العديد من الأعضاء و كذلك الغدد الصماء في الجسم. تتمثل أهداف عملنا في تحديد التأثيرات السامة للكروم سداسي التكافؤ على وظيفة الغدة الدرقية في الجرذان الحوامل من سلالة *Albinos Wistar* قسمت الجرذان الحوامل إلى سبعة مجموعات و عولجت في اليوم الثالث من الحمل، تلقت 100 مغ /كغ من ثاني كرومات البوتاسيوم ($K_2Cr_2O_7$) في حين تلقت المجموعات الثلاث المتبقية 10 مغ / كغ من $K_2Cr_2O_7$ مع 0,3 مغ/كغ من السيلينيوم أو مع 20 مغ/كغ من ثاني كلوريد الزنك، أو العناصر الثلاثة في وقت واحد. تم أخذ عينات الدم في اليومين اليوم السادس و اليوم العشرين و كذلك تم أخذ عينات من الأنسجة في اليوم العشرين.

تسبب التعرض ل $K_2Cr_2O_7$ في انخفاض وزن الجرذان الحوامل و زيادة الوزن المطلق والنسبي للغدة الدرقية كما أشارت النتائج المتحصل عليها إلى أن $K_2Cr_2O_7$ يسبب تراكم الكروم مما أدى إلى حدوث قصور هرموني و أضرار في البنية النسيجية للغدة الدرقية. كشفت النتائج أيضا أن التعرض ل $K_2Cr_2O_7$ أدى إلى زيادة مستويات بيروكسيدات الدهون، البروتينات المؤكسدة و نشاط الإنزيمات المضادة للأكسدة في نسيج الغدة الدرقية، كما أشارت المعطيات أيضا إلى حدوث الموت الخلوي المبرمج، تلف الحمض النووي و تكوين النوى الدقيقة. بينت الدراسة أيضا السيلينيوم و الزنك خفا السمية الدرقية الناجمة عن $K_2Cr_2O_7$ في الجرذان الحوامل من خلال إظهار تأثيرات مضادة السموم، مضادة للأكسدة و الموت الخلوي و واقية ضد التلف الجيني، ومع ذلك أظهر العلاج المشترك باستعمال السيلينيوم و الزنك معا تأثيرات واقية أقل نجاعة لهذا يوصى القيام بدراسات إضافية حول التفاعل التآزري بين السيلينيوم و الزنك ضد سمية CrVI باستخدام جرعات و طرق للتعرض مختلفة.

الكلمات المفتاحية : الكروم سداسي التكافؤ، السيلينيوم، الزنك، السمية الدرقية، السمية الجينية، الإجهاد التأكسدي، الجرذان الحوامل.

Abstract

Hexavalent chromium (CrVI) is a toxic heavy metal and a major environmental pollutant due to its bioaccumulation in ecosystems; it also exerts deleterious effects in several organs as well as endocrine glands in the body. The aims of our work are to determine the toxic effect of hexavalent chromium on thyroid function in pregnant *Albino Wistar* rats and to assess the protective effects of selenium and zinc against this toxicity. Pregnant *Albino Wistar* rats were divided into 7 groups and treated on the 3rd day of gestation; the first group received 0.9% NaCl and served as a control; the 2nd, 3rd and the 4th groups were injected subcutaneously by 10, 50 and 100 mg / kg. pc of K₂Cr₂O₇; the remaining three groups received 10 mg / kg. pc of K₂Cr₂O₇ in combination with 0.3 mg / kg. pc of Se, or 20 mg / kg. pc of ZnCl₂, or with all three elements simultaneously. The blood was collected on the 6th and the 20th day. Then, rats were sacrificed and target tissues were removed on the 20th day of pregnancy. The exposure to K₂Cr₂O₇ decreased body growth in female rats and increased absolute and relative thyroid weights. The results obtained indicated that K₂Cr₂O₇ promoted the bioaccumulation of Cr in the thyroid and induced hypothyroidism and histological alterations, lipid peroxidation, protein carbonylation, increased activities of anti-oxidant enzymes and induction of apoptosis, DNA fragmentation and micronuclei formation. The co-administration with Se and ZnCl₂ attenuated the thyrotoxicity induced by K₂Cr₂O₇ in pregnant *Wistar Albino* rats by exhibiting chelative, antioxidant, anti-apoptotic and genoprotective effects. However, simultaneous co-treatment with both Se and ZnCl₂ showed less pronounced thyroprotective effects and therefore additional studies on the synergistic interaction of Se and Zn against CrVI toxicity using different doses and routes of exposure are recommended.

Key words: Hexavalent chromium; Selenium; Zinc; Thyrotoxicity; Genotoxicity; oxidative stress; Pregnant rats.

Remerciements

*Avant toute chose, je remercie « **ALLAH** », l'omnipotent, pour m'avoir donné la force, la patience et le courage pour mener ce travail à son terme.*

*Je souhaite remercier ma directrice de thèse, Madame **ADJROUD OUNASSA**, Professeure à l'université de Batna-2 et Directrice du Laboratoire de Physiotoxicologie, Pathologies Cellulaires et Moléculaires- Biomolécules (**LPTPCMB**) pour m'avoir enseigner et encadrer durant mes études de licence, master et doctorat. Je lui suis également reconnaissante pour le temps conséquent qu'elle m'a accordé, ses qualités pédagogiques et scientifiques, sa franchise et sa sympathie durant mes années d'études à ses cotés. Merci Madame pour la bonne humeur, la disponibilité, la serviabilité et le dynamisme que m'ont encouragé à être toujours active et sérieuse. Je vous remercie du fond du cœur, je voudrais vous l'exprimer d'une façon meilleure que celle-ci mais les mots ne pourront jamais décrire mon respect et mon amour envers votre personne. Que vous trouvez ici Madame, le témoignage de mon plus profond respect.*

Je suis très honorée à remercier de la présence à mon jury de thèse et je tiens à remercier :

*Madame **SAIDI MAHDIA**, Professeure à l'université de Batna-2 et la responsable du service d'hématologie au centre anti- cancer (CAC) à Batna pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de présider mon jury de thèse, pour le temps consacré à la lecture de cette thèse, et pour les suggestions et les remarques judicieuses qu'elle m'a indiquées.*

*Monsieur **BENOUNE OMAR**, Professeur à l'université de Batna-1, pour sa participation à mon jury de thèse en qualité de rapporteur de mon travail. Merci Monsieur pour toutes vos remarques intéressantes qui ne cessent que d'améliorer ce travail.*

*Monsieur **SAFSAF BOUBKEUR**, Professeur à l'université de Batna-1 pour l'honneur m'a fait pour sa participation à mon jury de thèse en qualité de rapporteur de mon travail. Je tiens à l'assurer de ma profonde reconnaissance pour l'intérêt qu'il porte à ce travail.*

*Monsieur **BOUARROUDJ MOHAMED** Professeur à l'université de Batna-2 et chef de service à la maternité de Bouattoura pour l'intérêt et l'attention qu'il a accordé à ce travail de thèse, et pour avoir accepté de faire partie de ce jury malgré ses multiples occupations.*

*Je tiens à remercier Madame **SALWA ABID-ESSEFI**, Professeure à la Faculté de Médecine Dentaire de Monastir, d'avoir accepté de m'accueillir dans son laboratoire de*

Recherche sur les Substances Biologiquement Compatibles (LRSBC) et de m'avoir donné la chance de réaliser des stages au sein de son unité de recherche.

*Je voudrais exprimer ma très grande considération et ma vive reconnaissance à Monsieur **BENOUNE OMAR**, Professeur à l'université de Batna-1, qui m'a permis de travailler au sein de son laboratoire. Un remerciement particulier à Madame **Naima**, ingénieure à laboratoire Environnement, Santé et Production Animale- Université Batna-1 qui m'a aidé pour la réalisation des coupes histologiques. Merci beaucoup pour votre aide.*

*Je voudrais exprimer ma profonde reconnaissance pour Monsieur **FOUGHALIA ABDELHAMID**, Docteur au centre de recherche scientifique et technique sur les régions arides (CRSTRA) pour son aide précieuse, et ses conseils inestimables. Merci beaucoup.*

*J'exprime ma reconnaissance toute particulière et ma gratitude, qui ne seront jamais concrètement exprimées à l'égard de mon amie et chère sœur **RIM TIMOUMI**, docteure à la faculté de médecine dentaire de Monastir pour son aide précieuse et chaleureuse et son inestimable collaboration afin de réaliser mes dosages au sein de LRSBC. Merci Rimoucha pour ton soutien et tes encouragements.*

*Je désire grandement de remercier mon ami **ZEGHIOUD HICHEM**, docteur à l'institut national polytechnique de Toulouse (INP) pour son rigueur scientifique, ses conseils et son soutien durant la préparation de ce travail de recherche. Merci infiniment Hichem.*

*Je voudrais exprimer mes remerciements et ma gratitude à mon cher frère **CHAOUCHE LIOUA EDDINE AYMAN** pour ses encouragements, son aide et sa générosité, Merci infiniment **AYMAN**.*

*Je désire en outre remercier les membres de LRSBC, **ANNABI EMNA** pour sa gentillesse et ses « positive vibes », **AMARA INES** pour sa sympathie et encouragements. Je désire également de remercier **HIBA HAMDI**, **INTIDHAR BEN SALEM**, **CHOUCHENE SALWA** et sans oublier **TATA ASSIA**.*

*Je tiens également à remercier tous les membres de LPPCMB. J'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec eux. Merci à mes chères collègues **SALAH IMANE**, **BOULILA ISMAHENE** et **SAOULI ASMA** pour leurs conseils avisés, leurs aides et leur bonne humeur.*

Enfin, une pensée pour tous les rats utilisés au cours de cette thèse : sans eux ce travail n'aurait pas été abouti !

Dédicace

A MA TRES CHERE MERE FARIDA

Cette thèse est le fruit de ton amour, ton soutien, tes encouragements et tes prières. Ton amour, ta tendresse et ta générosité illimitée ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

J'espère que tu trouveras dans ce travail un témoignage de ma gratitude, ma profonde affection et mon profond respect. Puisse Dieu tout puissant te protéger du mal, te procurer longue vie, santé et bonheur. J'aimerais pouvoir te rendre tout l'amour et la dévotion que tu nous as offerts, mais une vie entière n'y suffirait pas. J'espère au moins que cette thèse y contribuera en partie. Je t'aime fort ma Fati...

A MON TRES CHER PERE KAMEL

Les mots ne pourront jamais exprimer la profondeur de mon respect, ma considération, ma reconnaissance et mon amour. Que Dieu te préserve des malheurs de la vie et te prête une bonne santé. Je t'aime papa...

A MA TRES CHERE ET ADORABLE SŒUR ABIR

Ma très chère sœur et amie, je ne pourrais d'aucune manière exprimer ma profonde affection et mon immense gratitude pour tous les sacrifices consentis, votre aide et votre générosité extrêmes ont été pour moi une source de courage, de confiance et de patience. J'implore DIEU qu'il vous apporte le bonheur, l'amour et que vos rêves se réalisent. Je t'aime énormément Aboura...

A Mon CHER FRERE AHMAD ZAKARIA

Je te remercie, pour ton support et tes encouragements, pour tous les moments de joie qu'on a pu partager ensemble. Puisse DIEU, le tout puissant, te préserver du mal, te combler de santé et de bonheur. Je t'aime Zakou...

A LA MEMOIRE DE MES CHERSGRANDS PARENTS MEBARKA ET AMMAR

A mes chères MEBARKA et AMMAR, j'aurais aimé que vous étiez la pour moi. Qu'ALLAH vous accorde sa miséricorde et son pardon éternel.

A Tous mes Enseignant(e)s depuis l'école primaire à l'université : Respect et Reconnaissance

Abréviations

Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

Bcl-2 : B-cellymphoma 2

BER : Base excision repair

BET: Le bromure d'éthidium

BSA: Albumine sérique bovine

CDNB: 1- Chloro- 2, 4- dinitrobenzene

CFTR: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

cGPx : Glutathion peroxydase cytosolique

CAT : Catalase

CrIII: Chrome trivalent

CrVI: Chrome hexavalent

DBD: DNA binding domain

DIO: iodothyronine déiodinases

DIT: Di- iodotyrosine

DMSO: Diméthylsulfoxyde

DNPH: 2, 4-dinitrophenylhydrazine

DRIP: vitamin D receptor- interacting protein

DTNB: le 5, 5- dithiobis- 2- nitrobenzoicacid

DUOX2: NADPH double oxydase 2

ECL: Electro-chimiluminescence

ERN: espèces réactives d'azote

Abréviations

ERO: Espèces réactives de l'oxygène

GH: Growth hormone

GI-GPx : Glutathion peroxydase gastro-intestinal

GPx: Glutathion peroxydase

GS α : Protéine G stimulatrice α

GST : Glutathion-S- transférase

HDAC : Histones désacétylases (HDAC)

JAK2/ STAT3 : The Janus kinase-signal transducers and activators of transcription

K₂Cr₂O₇ : Le dichromate de potassium

LBD : ligand binding domain

LMA : L'agarose à bas point de fusion

MDA: Malondialdehyde

MIT: Mono- iodotyrosine

NBT: Nitro-blue-tetrazolium

NER: Nucleotide excision repair

NIS: Natrium Iodide Symporter

NMA : l'agarose à point de fusion normal

p53 : Tumor protein 53

PBS : Le tampon de phosphate en solution

pc : poids corporel

PC : Protéines carbonylées

pGPx : Glutathion peroxydase plasmatique

PHGPx : Glutathion peroxydase de l'hydro-péroxyde de phospholipide

Abréviations

PIP2 : La phospholipase C-dépendante inositol phosphate

pNA : para-nitroaniline

PRL : Prolactine

RXR : Retinoid-X receptor

SAA : Spectrométrie d'absorption atomique

Se : Sélénium

SOD : Superoxyde dismutase

T3 : Tri-iodothyronine

T4: Thyroxine

TAF: TBP- associated factor

TBA: l'acide thiobarbiurique

TBP: TATA box- binding protein

TCA: l'acide trichloro-acétique

TFIIB : Transcription factor IIB

TGB : la globuline liant la thyroxine

TNF α : Tumor necrosis factor α

TPO: Thyroperoxydase

TR: Thyroid hormone receptor

TRAP: Thyroid hormone receptor- associated protein

TREn: Eléments de réponse négative des hormones thyroïdiennes

TREp: Eléments de réponse positive des hormones thyroïdiennes

TRH: Thyrotropin-releasing hormone

Trx : Thiorédoxine réductases

Abréviations

TSH: Thyroid-stimulating- hormone

TSHr: Thyroid stimulating hormone receptor

TTR : La transthyréline

ZnCl₂ : Chlorure de zinc

Table des matières

Table des matières

Introduction	1
---------------------------	----------

Etude bibliographique

1-1-La glande thyroïdienne	4
1-1-1- Rappel anatomo-histologique.....	4
1-1-2- L'hormonogenèse thyroïdienne.....	5
1-1-3- Mode d'action des hormones thyroïdiennes.....	8
1-1-3-1-Récepteurs des hormones thyroïdiennes.....	8
1-1-3-2- Modulation transcriptionnelle des gènes cibles des hormones thyroïdiennes.....	8
1-1-4- La régulation de la sécrétion des hormones thyroïdiennes.....	9
1-1-5- Les perturbateurs thyroïdiens.....	11
1-2-Le chrome et ses dérivés	13
1-2-1-Définition et rappels généraux sur le chrome.....	13
1-2-2-Utilisations et sources d'exposition du chrome.....	13
1-2-3- La toxico-cinétique du CrVI.....	14
1-2-3-1- Les voies d'absorption du CrVI.....	14
1-2-3-2- Distribution.....	15
1-2-3-3- Métabolisme.....	15
1-2-3-4- Elimination.....	16
1-2-4-La toxico-dynamique du CrVI.....	17
1-2-5-Processus toxiques du CrVI.....	18
1-2-5-1-Induction de la peroxydation lipidique.....	18
1-2-5-2-Induction de l'oxydation des protéines.....	19
1-2-5-3-Induction de l'apoptose.....	19

Table des matières

1-2-5-4-Induction de la génotoxicité, la mutagénicité et la carcinogénicité.....	20
1-2-6-La toxicité du CrVI.....	21
1-2-6-1-Effet hématotoxique du CrVI.....	21
1-2-6-2-Effet hépatotoxique du CrVI.....	22
1-2-6-3-Effet néphrotoxique du CrVI.....	22
1-2-6-4-Effet neurotoxique du CrVI.....	23
1-2-6-5-La perturbation endocrinienne et la reprotoxicité.....	23
1-3-Les oligo-éléments.....	25
1-3-1- Le sélénium.....	25
1-3-1-1-Importance biologique du sélénium.....	25
a- Le glutathion peroxydase.....	26
b- La thiorédoxine réductase.....	26
c- Les iodothyronine déiodinases.....	27
1-3-1-2-Processus et actions protectifs.....	29
a- Action détoxifiante des métaux toxiques.....	29
b- Actions anti-oxydante et chemopreventive.....	30
c- Actions genoprotective, anti-cancérigène et anti-métastatique.....	30
1-3-1-Le zinc.....	30
1-3-2-1- Effets protecteurs du zinc.....	30
a- Action détoxifiante des métaux oxydants.....	30
b- Action anti-oxydante.....	31
c- Action anti-apoptotique.....	31
d- Action genoprotective.....	32
e- Actions anti- cancérigène et anti-tumorale.....	32
Objectifs du travail.....	35

Table des matières

Partie expérimentale

1-Matériel et méthodes	37
1-1-Matériel	37
1-1-1- Animaux.....	37
1-1-2- Produits chimiques et réactifs.....	38
1-2- Méthodes	39
1-2-1- Traitements des rates.....	39
1-2-2- Prélèvements des tissus.....	40
1-2-2-1- Prélèvement du sang.....	40
1-2-2-2- Prélèvement de la glande thyroïdienne.....	40
1-2-2-3- Prélèvement de la moelle osseuse.....	40
1-2-3- L'évaluation du poids corporel et thyroïdien.....	40
1-2-4- Le dosage des hormones thyroïdiennes.....	41
1-2-4-1- La quantification des concentrations plasmatiques en T3 et T4.....	41
1-2-4-2- La quantification des concentrations plasmatiques en TSH.....	43
1-2-5- l'étude histologique.....	44
1-2-6- Détermination de la concentration thyroïdienne en chrome.....	47
1-2-6-1- Préparation des solutions, étalons et matériels utilisés.....	47
1-2-6-2- La minéralisation.....	49
1-2-6-3- Blanc de la minéralisation.....	50
1-2-6-4- La détermination de la concentration en chrome dans l'extrait thyroïdien.....	51
1-2-7- Dosage des bio-marqueurs du stress oxydant et les enzymes anti-oxydantes.....	52
1-2-7-1- Broyage et extraction des protéines à partir du tissu thyroïdien.....	52
1-2-7-2- Dosage des protéines totales.....	53

Table des matières

1-2-7-3- Evaluation de la lipo-peroxydation : Test de MDA.....	54
1-2-7-4- Evaluation de la carbonylation des protéines.....	56
1-2-7-5- Détermination de l'activité de la catalase.....	58
1-2-7-6- Détermination de l'activité du superoxyde dismutase.....	60
1-2-7-7- Détermination de l'activité de la glutathion peroxydase.....	62
1-2-7-8- Détermination de l'activité du glutathion- S- transférase.....	64
1-2-8- Estimation du taux de l'apoptose via la voie de la caspase- 3.....	65
1-2-9-Tests de la génotoxicité.....	67
1-2-9-1- Evaluation de la fragmentation d'ADN dans la thyroïde et la moelle osseuse.....	67
1-2-9-2- Test de micronoyaux dans la moelle osseuse.....	70
1-2-10- Analyse bio-statistique.....	72
2- Résultats.....	73
2-1- L'évaluation du poids corporel maternel et le poids absolu et relatif de la thyroïde.....	73
2-1-1- L'effet de l'administration des doses croissantes du $K_2Cr_2O_7$ sur le poids corporel maternel.....	73
2-1-2- L'effet de l'administration des doses croissantes du $K_2Cr_2O_7$ sur le poids absolu de la glande thyroïdienne maternelle.....	73
2-1-3- L'effet de l'administration des doses croissantes du $K_2Cr_2O_7$ sur le poids relatif de la glande thyroïdienne maternelle.....	73
2-1-4- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se, le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur le poids corporel maternel.....	74
2-1-5- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se, le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur le poids absolu thyroïdien des rates gestantes.....	75
2-1-6- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se, le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur le poids relatif thyroïdien des rates gestantes.....	75

Table des matières

2-2- L'évaluation du profil hormonal de l'axe hypophyso-thyroïdien.....	77
2-2-1- L'effet de l'administration des doses croissantes du $K_2Cr_2O_7$ sur la concentration plasmatique en T3.....	77
2-2-2- L'effet de l'administration des doses croissantes du $K_2Cr_2O_7$ sur la concentration plasmatique en T4.....	78
2-2-3- L'effet de l'administration des doses croissantes du $K_2Cr_2O_7$ sur la concentration plasmatique en TSH.....	79
2-2-4- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se, le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur le taux plasmatique de la T3.....	80
2-2-5- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se, le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur le taux plasmatique de la T4.....	82
2-2-6- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se, le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur le taux plasmatique de la TSH.....	83
2-3- L'étude histologique.....	85
2-3-1- L'effet de l'administration des doses croissantes du $K_2Cr_2O_7$ sur l'histoarchitecture thyroïdienne.....	85
2-3-2- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se, le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur l'histoarchitecture thyroïdienne.....	90
2-4- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se et le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur la bioaccumulation du Cr dans la thyroïde.....	93
2-5- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se et le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur l'activité de la caspase- 3 dans la thyroïde.....	95
2-6- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se et le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur les bio-marqueurs du stress oxydatif dans la thyroïde.....	97
2-6-1- Le taux des protéines carbonylées.....	97
2-6-2- Le taux de malondialdehyde.....	98

Table des matières

2-7- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se et le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur les activités des enzymes anti-oxydantes dans la thyroïde.....	100
2-7-1- La catalase.....	100
2-7-2- Le superoxyde dismutase.....	101
2-7-3- Le glutathion peroxydase.....	102
2-7-4- Le glutathion- S- transférase.....	103
2-8- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se et le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur le score total de la fragmentation d'ADN dans la thyroïde.....	105
2-9- Induction de la fragmentation d'ADN et la formation des micronoyaux dans la moelle osseuse.....	107
2-9-1- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se et le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur le score total de la fragmentation d'ADN dans la moelle osseuse.....	108
2-9-2- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se et le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur l'induction des micronoyaux dans la moelle osseuse.....	109
2-9-3- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se et le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur l'induction de la cytotoxicité dans la moelle osseuse.....	113
3- Discussion.....	115
Conclusions et perspectives.....	132
Références bibliographiques.....	134

Liste des figures

Liste des figures

Fig.1 La glande thyroïdienne : vue de devant (à gauche) et de derrière (à droite).....	4
Fig. 2 Photomicrographies des sections histologiques de la glande thyroïdienne.....	5
Fig. 3 Les voies de la biosynthèse des hormones thyroïdiennes T3 et T4 dans la cellule folliculaire thyroïdienne.....	5
Fig.4 Les hormones thyroïdiennes.....	7
Fig.5 L'activation et la répression transcriptionnelle des gènes cibles par la T3.....	9
Fig.6 La régulation de la sécrétion des hormones thyroïdiennes.....	9
Fig.7 L'action cellulaire de la TSH.....	10
Fig. 8 Les sites d'actions des perturbateurs thyroïdiens.....	12
Fig. 9 Les deux voies de la réduction intracellulaire du chrome hexavalent.....	15
Fig. 10 Les principales étapes de la toxicococinétique et toxicodynamique du CrVI par l'organisme.....	16
Fig.11 Dommages macromoléculaires par le stress oxydant et nitrique.....	17
Fig. 12 Mécanisme en chaîne de la peroxydation lipidique.....	18
Fig. 13 Mécanismes d'induction de l'apoptose par le CrVI.....	19
Fig. 14 La formation des adduits Cr-ADN-protéines.....	20
Fig. 15 Les actions des sélénoprotéines dans l'organisme.....	23
Fig. 16 L'activité catalytique du GPx et site actif de la protéine montrant la triade catalytique.....	24
Fig. 17 L'activité catalytique et les fonctions biologiques des TrxR.....	25
Fig. 18 Le métabolisme des hormones thyroïdiennes médiée par les trois iodothyronine déiodinases DIO1, DIO2 et DIO3.....	25
Fig. 19 Processus protecteurs des composés de sélénium contre les effets toxiques des métaux.....	27
Fig.20 Fonction du couple MT / T pour le maintien de l'homéostasie du zinc.....	28
Fig.21 L'action anti-apoptotique du zinc.....	29

Liste des figures

Fig.22 L'implication du zinc dans l'activation de la voie de la p53.....	30
Fig. 23 Répartition des groupes et protocole expérimental.....	36
Fig.24 Représentation schématique du système d'amplification du complexe avidine–biotine.....	39
Fig.25 Schéma représente les étapes du déparaffinage, réhydratation, coloration et déshydratation.....	43
Fig. 26 La courbe d'étalonnage du chrome (photo a été prise à partir du micro-ordinateur attaché au SAA à flamme PerkinElmer).....	46
Fig.27 Schéma réactionnel de dosage de l'activité caspase-3 (DEVD-ase).....	63
Fig. 28 Effets de l'administration des doses croissantes du $K_2Cr_2O_7$ sur la concentration plasmatique en T3.....	75
Fig. 29 Effets de l'administration des doses croissantes du $K_2Cr_2O_7$ sur la concentration plasmatique en T4.....	76
Fig. 30 Effets de l'administration des doses croissantes du $K_2Cr_2O_7$ sur la concentration plasmatique en TSH.....	77
Fig.31 Effets de la co-administration du $K_2Cr_2O_7$ avec le Se, le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur la concentration plasmatique en T3.....	78
Fig.32 Effets de la co-administration du $K_2Cr_2O_7$ avec le Se, le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur la concentration plasmatique en T4.....	80
Fig.33 Effets de la co-administration du $K_2Cr_2O_7$ avec le Se, le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur la concentration plasmatique en TSH.....	81
Fig. 34 Photomicrographie d'une coupe histologique (H & E) de la glande thyroïdienne du group témoin (Ctr).....	82
Fig. 35 Photomicrographies des coupes histologiques (H & E) de la glande thyroïdienne des rates gestantes traitées par la faible dose du $K_2Cr_2O_7$	84
Fig.36 Photomicrographies des coupes histologiques (H & E) de la glande thyroïdienne des rates gestantes traitées par la moyenne dose du $K_2Cr_2O_7$	85

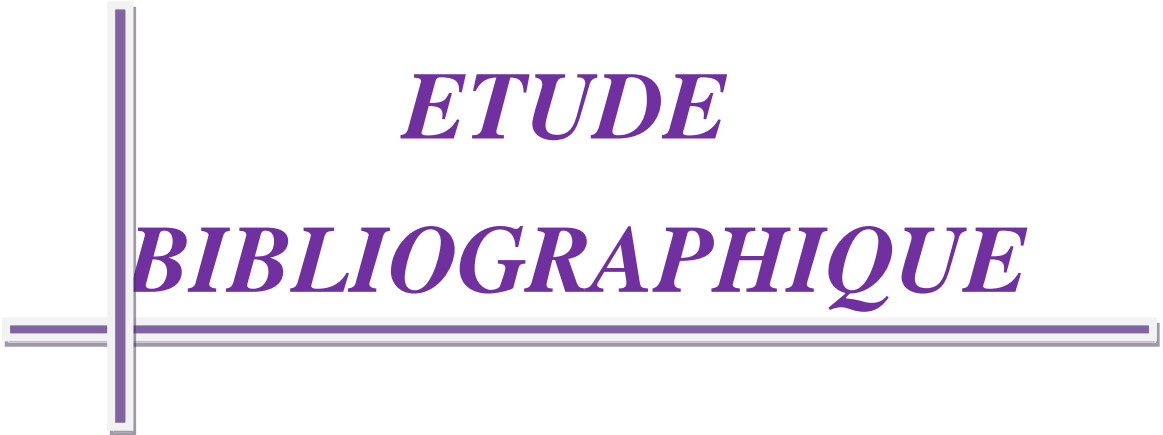
Liste des figures

- Fig. 37** Photomicrographies des coupes histologiques (H & E) de la glande thyroïdienne de des rates gestantes intoxiquées par la forte dose du $K_2Cr_2O_7$ 86
- Fig. 38** Photomicrographies des coupes histologiques (H & E) de la glande thyroïdienne des rates gestantes traitées avec le $K_2Cr_2O_7$ en association avec le Se.....87
- Fig. 39** Photomicrographies des coupes histologiques (H & E) de la glande thyroïdienne des rates gestantes traitées avec le $K_2Cr_2O_7$ en association avec le $ZnCl_2$ 88
- Fig. 40** Photomicrographies des coupes histologiques (H & E) de la glande thyroïdienne des rates gestantes traitées avec le $K_2Cr_2O_7$ en association simultanée avec le Se et le $ZnCl_2$89
- Fig.41** Effets de la co-administration du Se, $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur la bioaccumulation du Cr dans la thyroïde.....91
- Fig. 42** Effets de la co-administration du $K_2Cr_2O_7$ avec Se, $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur l'activité de la caspase- 3.....93
- Fig. 43** Les différentes classes de comètes colorées par le BET et visualisées sous microscope à fluorescence Nikon Eclipse TE 300.....102
- Fig.44** Effets de la co-administration du $K_2Cr_2O_7$ avec le Se, le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur le score total de la fragmentation d'ADN dans la thyroïde.....104
- Fig.45** Effets de la co-administration du $K_2Cr_2O_7$ avec le Se, le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur le score total de la fragmentation d'ADN dans la moelle osseuse.....105
- Fig.46** Effets de la co-administration du $K_2Cr_2O_7$ avec le Se, le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur l'induction de micronoyaux dans la moelle osseuse.....107
- Fig.47** La visualisation des PCE (cellules fluorescentes rouges), NCE (cellules fluorescentes vertes) et PCEMNs (globules rouges évanouis avec des taches fluorescentes jaunes : tête de flèche) sous microscope à fluorescence (Nikon, Japon).....109
- Fig.48** Effets de la co-administration du $K_2Cr_2O_7$ avec le Se, le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur l'induction de la cytotoxicité dans la moelle osseuse.....111

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les utilisations industrielles de quelques composés de chrome.....	13
Tableau 2 : Rôles physiologiques des trois iodothyronine déiodinases.....	26
Tableau 3 : Composition de la formule alimentaire de l'aliment (%).....	33
Tableau 4 : Des informations sur la performance des immunodosages Elecsys® TSH, T4 et T3.....	38
Tableau 5 : Valeurs de consensus du matériel de référence.....	47
Tableau 6 : L'effet de l'administration des doses croissantes du $K_2Cr_2O_7$ sur le poids corporel maternel et le poids absolu et relatif de la thyroïde.....	71
Tableau 7 : Effets de la co-administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se, $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur le poids corporel maternel et le poids absolu et relatif thyroïdien.....	73
Tableau 8 : Effets de la co-administration du $K_2Cr_2O_7$ avec le Se et le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur le taux des bio-marqueurs du stress oxydant dans la thyroïde.....	96
Tableau 9 : Effets de la co-administration du $K_2Cr_2O_7$ avec Se et $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur les activités des enzymes anti-oxydantes dans la thyroïde.....	101



***ETUDE
BIBLIOGRAPHIQUE***



***INTRODUCTION
GENERALE***

Introduction générale

La glande thyroïdienne joue un rôle important dans le déroulement de plusieurs processus biologiques, ainsi, elle régit la plupart des voies métaboliques et elle participe dans le maintien de l'homéostasie de l'organisme. De ce fait, elle est sensible à l'effet des perturbateurs thyroïdiens notamment les contaminants industriels, les métaux lourds et les insecticides. En effet, la glande thyroïde est connue pour être une cible à une large gamme des perturbateurs endocriniens en raison de ses propriétés structurelles et fonctionnelles complexes (**Boas *et al.*, 2006 ; Rana *et al.*, 2014**). Ces perturbateurs peuvent également affecter l'homéostasie thyroïdienne en plusieurs sites de la biosynthèse et le métabolisme des hormones ainsi que leurs actions biologiques dans les cellules cibles (**Gilbert *et al.*, 2012**).

Le chrome hexavalent (CrVI) est parmi les métaux lourds les plus dangereux affectant la santé humaine et animale, il est omniprésent dans l'environnement soit naturellement ou par le moyen de son utilisation accrue dans plusieurs activités industrielles y compris la métallurgie, l'électrodeposition de chrome, l'industrie chimique, la fabrication de textile, la conservation de bois, la photographie et les industries d'acier inoxydable de photogravure, et les systèmes de refroidissement. En effet, la présence des composés hexavalents du chrome dans l'environnement résulte principalement des rejets industriels dans les sols, l'atmosphère (émissions atmosphériques industrielles) et les eaux (stations d'épuration). Il est non biodégradable et persiste dans les organismes vivants. Néanmoins, il est souvent transformé en chrome trivalent mais cela dépend de plusieurs conditions (**Cohen *et al.*, 1993 ; Richelmi et Baldi 1984 ; IARC 1990**). La toxicité du chrome varie considérablement en fonction de la voie et la durée d'exposition, ainsi que l'état de valence de ses composés. Ainsi, il exerce sa cytotoxicité en générant un stress oxydant, résultant de la surproduction des radicaux libres lors de sa réduction intracellulaire et de la déplétion de la défense anti-oxydante cellulaire. En conséquence, les radicaux libres ciblent et endommagent par oxydation les macromolécules comme les lipides membranaires, les protéines et les acides nucléiques en engendrant leur détérioration structurelle et fonctionnelle, ce qui se traduit par l'induction de l'hématotoxicité, l'hépatotoxicité, la néphrotoxicité, la neurotoxicité et la reprotoxicité (**Adjroud, 2010 ; Adjroud, 2013 Soudani *et al.*, 2011 ; Goodarzi *et al.*, 2017 ; Travacio *et al.*, 2000 ; Jahnabi *et al.*, 2017**). En outre, plusieurs études antérieures ont signalé les effets perturbateurs thyroïdiens, ovariens et hypophysaires des composés hexavalents du chrome (**Banu *et al.*, 2008 ; Stanely *et al.*, 2013 ; Hassanin *et al.*, 2013**). Dans ce contexte, une multitude des éléments protecteurs possédant un pouvoir antioxydant ont été utilisés pour

contrebalancer les effets délétères du CrVI (**Khalil et al., 2013 ; García-Rodríguez et al., 2013 ; Adjroud 2010**). Le sélénium et le zinc sont considérés comme des éléments traces métalliques essentiels impliqués dans plusieurs processus physiologiques dans l'organisme. En plus, ils sont connus d'être des cofacteurs des enzymes anti-oxydantes qui jouent un rôle capital dans la neutralisation des espèces réactives et radicaux libres. Outre leurs pouvoirs antioxydants, ils disposent des propriétés chemopreventive, genoprotective et anti-cancérogènes (**Tarasub et al., 2008 ; Yildiz et al., 2019**). En regard de leurs effets prophylactiques potentiels, plusieurs travaux ont montré que le sélénium et le zinc ont atténué les toxicités induites par les métaux lourds incluant le plomb, l'arsenic et le cadmium (**Messarah et al., 2012 ; Messaoudi et al., 2009 ; Wang et al., 2018**).

Peu d'études ont été consacrées à l'investigation des effets thyrotoxiques des métaux lourds pendant la gestation, en particulier le chrome hexavalent. A la lumière de ces données, notre étude est menée pour investiguer les effets thyrotoxiques du chrome hexavalent chez la rate gestante *Albinos Wistar* durant la période de la pré-implantation, en se focalisant d'une part sur la mise en évidence de son impact toxique aux niveaux cellulaire et moléculaire et en recherchant d'autre part son éventuelle rémediation par le sélénium et zinc.

Pour atteindre les objectifs et répondre à la problématique posée dans la présente étude, on a présenté en premier temps une étude bibliographique qui englobe quatre chapitres ;

- dans le premier, on a présenté des notions anatomiques, histologiques et physiologiques de la glande thyroïdienne, ainsi que les effets de ces hormones sur l'organisme. En plus, on a présenté les perturbateurs thyroïdiens et leurs modes d'action.
- Dans le deuxième chapitre, on a abordé des généralités sur le chrome hexavalent, ses propriétés cinétiques et dynamiques, ainsi que ses effets sur les êtres vivants.
- Le dernier chapitre a été réservé pour le sélénium et le zinc, leurs propriétés, rôles biologiques et actions protectrices.
- La partie expérimentale repose sur deux volets :
- Le premier est consacré à la description de matériel et les méthodes utilisées

Introduction générale

- Le deuxième volet est réservé à l'analyse des résultats obtenus dans cette étude et leur discussion suivi d'une conclusion et perspectives à l'avenir.



***CHAPITRE 1: LA GLANDE
THYROÏDIENNE***

1-La glande thyroïdienne

1-1- Rappel anatomo-histologique

a- Rappel anatomique

La thyroïde est une glande impaire exclusivement endocrine qui sécrète principalement dans la circulation sanguine les hormones thyroïdiennes synthétisées au niveau des follicules thyroïdiens et stockées sous forme des précurseurs dans le colloïde (**Portulano et al., 2014**).

D'un point de vue anatomique (**Fig.1**), la thyroïde est un organe en forme de papillon, situé juste au- dessous du larynx. Elle est formée par deux lobes latéraux droit et gauche reliés par une partie rétrécie appelée l'isthme, lequel se repose devant la partie initiale de la trachée. Elle est enveloppée par une capsule fibreuse qui lui adhère. Elle est richement vascularisée par le moyen de cinq artères thyroïdiennes et un plexus formé par trois groupes distingués des veines. La glande est innervée par des rameaux des ganglions cervicaux sympathiques et des rameaux parasympathiques du nerf laryngé (**Tortora et Derrickson 2006**).

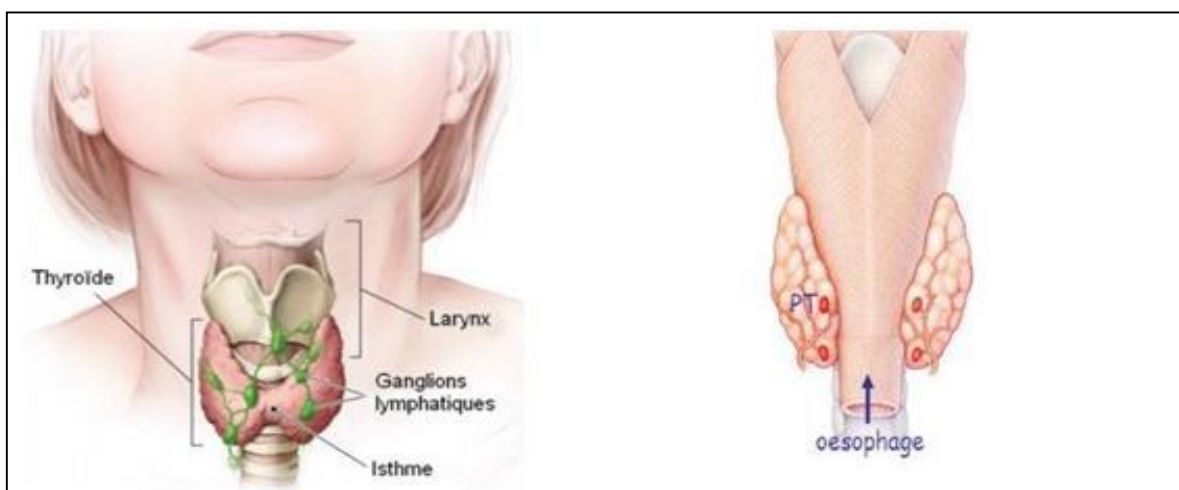


Fig.1 La glande thyroïdienne : vue de devant (à gauche) et de derrière (à droite) (**Young et al., 2006**).

b- Rappel histologique

D'un point de vue histologique (**Fig.2**), elle est enveloppée par une capsule constituée d'un parenchyme glandulaire. L'unité histo-fonctionnelle de la glande est le follicule thyroïdien, à la face intérieure de la capsule réside l'ensemble des vésicules thyroïdiennes qui sont bordées par un épithélium cubique simple responsable de la synthèse et la sécrétion des hormones iodées T3 et T4. Le colloïde des follicules est rempli d'un complexe glycoprotéique iodée

appelé thyroglobuline, correspondant à la forme de stockage des hormones avant leur sécrétion. Dans la thyroïde, il existe un second type cellulaire sécrétoire, sous forme de cellules isolées et dispersées dans l'espace inter-vésiculaire, ces cellules appelées cellules C para-folliculaires qui synthétisent et sécrètent la calcitonine (**Saber-Lichtenberg *et al.*, 2000 ;Young *et al.*, 2015**).

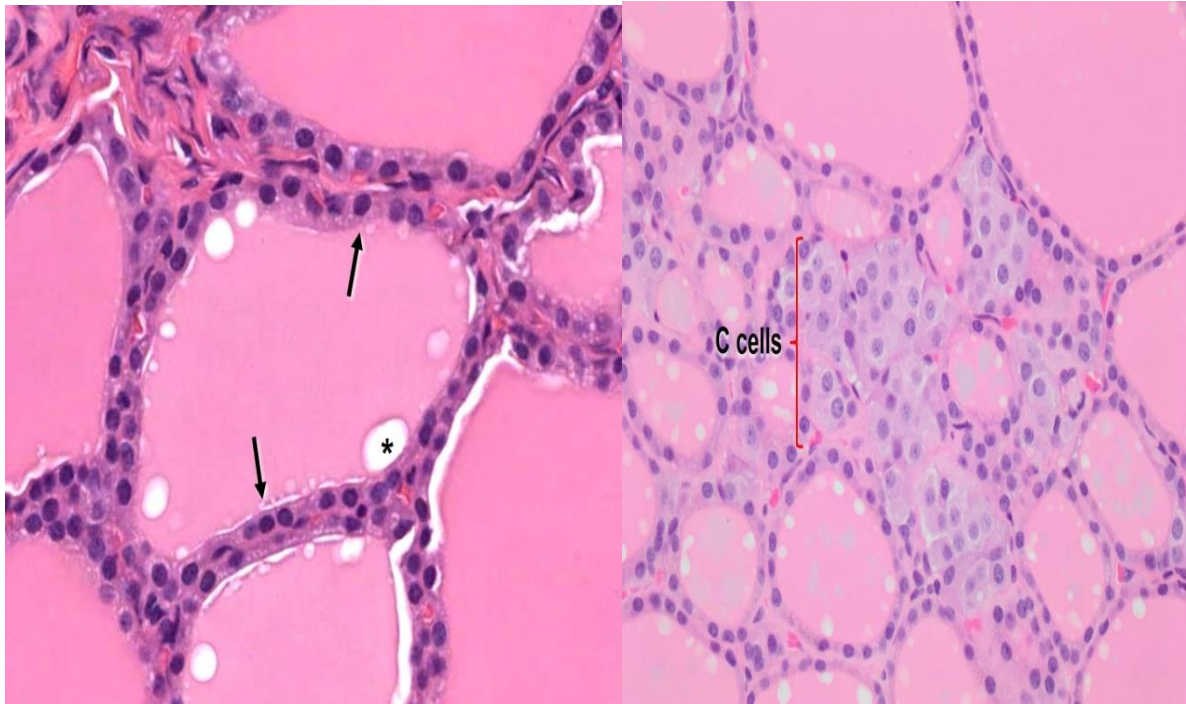


Fig. 2 Photomicrographies des sections histologiques de la glande thyroïdienne (**Jennings et Premanandan 2017**).

1-2- L'hormonogenèse thyroïdienne

La thyroïde est à l'origine de la production de deux hormones, la tri-iodothyronine (T3) et la thyroxine (T4) (**Fig.3**). Ainsi, la biosynthèse des hormones thyroïdiennes se déroule en plusieurs étapes successives en utilisant l'iode et la tyrosine comme des substrats précurseurs constructifs (**Dohan *et al.*, 2003**).

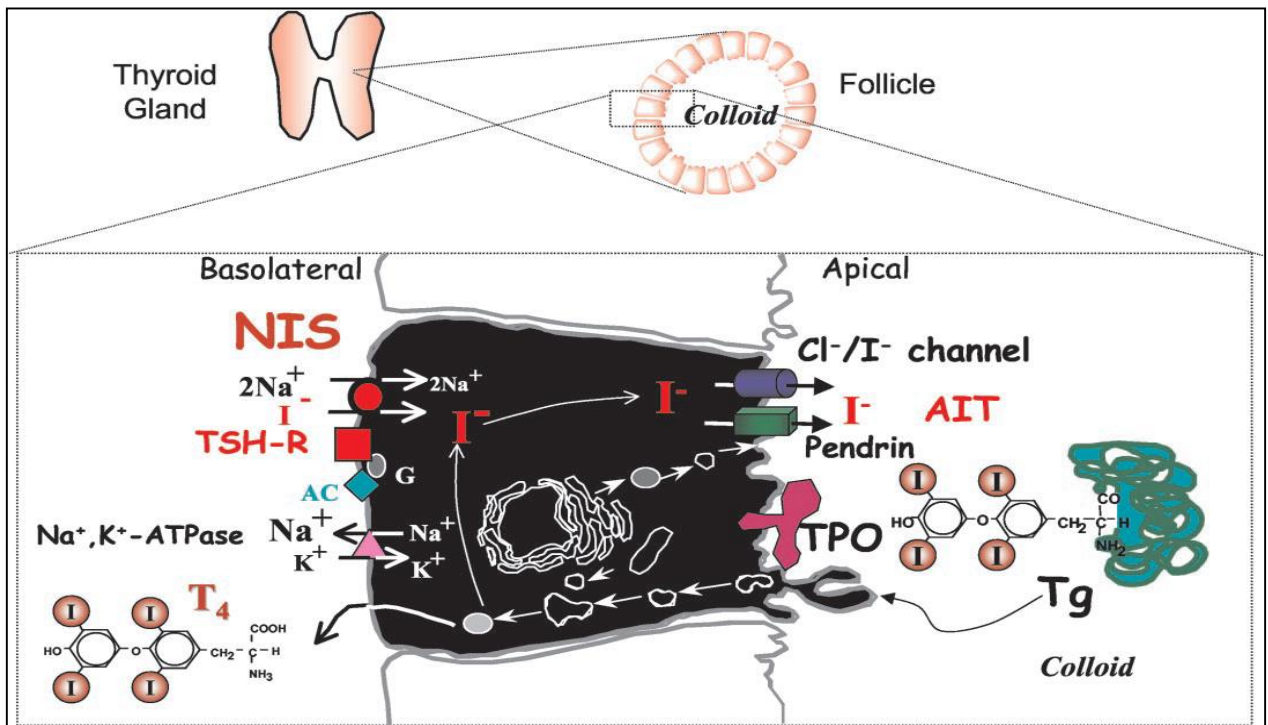


Fig. 3 Les voies de la biosynthèse des hormones thyroïdiennes T3 et T4 dans la cellule folliculaire thyroïdienne (Dohan *et al.*, 2003)

a- La capture d'iodure

La capture d'iodure se fait par l'intermédiaire d'un symporteur Na^+/I^- , appelé NIS. Chez le rat, cette protéine est constituée de 618 acides aminés codée par le gène *SLC5A5* (Dai *et al.*, 1996). Le NIS est situé dans la membrane basolatérale thyrocytaire et il catalyse le transport actif des ions iodures contre leur gradient grâce au flux des ions Na^+ dans le sens de leur gradient électrochimique. Deux cations de sodium Na^+ sont nécessaires pour l'entrée d'un ion iodure I^- . Les Na^+ retournent ensuite dans le milieu extracellulaire grâce à une pompe Na^+/K^+ , et les I^- sont soit transférés dans la lumière folliculaire, soit diffusent à l'extérieur de la cellule (Weiss *et al.*, 1984). Pour que la capture d'iodure se passe, le NIS doit être stimulé par la TSH (Leclère *et al.*, 2001).

b- Le passage d'iodure vers le colloïde

Parmi les effecteurs impliqués dans le passage de l'iodure au travers de la membrane apicale jusqu'au compartiment colloïdal, la pendrine (PDS/ *SLC26A4*). En effet, des mutations du gène *Slc26a4* ont entraîné une diminution d'efflux d'iodure vers le colloïde ainsi qu'un déficit d'organification d' I^- (Kopp 2000). En outre, le canal chlore CFTR, une protéine exprimée

dans la thyroïde semble être impliquée aussi dans le passage d'iodure. En effet, les sujets atteints par la fibrose kystique sont susceptibles d'avoir un hypothyroïdisme (**Li et al., 2010**).

c- L'organification des iodures et le couplage des iodotyrosines

L'oxydation d'I⁻ par la thyroperoxydase (TPO), nécessite la présence de H₂O₂ qui est lui-même généré par la NADPH double oxydase 2 (DUOX2) dont son activité est augmentée par une élévation de la concentration en Ca²⁺ intracellulaire (**Ris-Stalpers 2006**). Etant donné l'importance de H₂O₂ dans la synthèse hormonale, des mutations du gène codant pour la protéine DUOX2 sont désignées parmi les facteurs causant de l'hypothyroïdie congénitale (**Moreno et al., 2002**).

Après l'oxydation d'I⁻, la TPO catalyse l'iodation de résidus tyrosines de la thyroglobuline en attachant par une liaison covalente un iode pour former la mono-iodotyrosine (MIT) et/ ou deux iodures pour former la di-iodotyrosine (DIT). Ensuite, ces iodotyrosines sont couplés par une liaison éther catalysée par la TPO afin de former la T₃ et la T₄ (**Fig.4**). Une hydrolyse lysosomiale permet la libération des hormones T₃ et T₄ qui sont sécrétées au pôle basolatéral dans le sang (**Dedieu et al., 2010**).

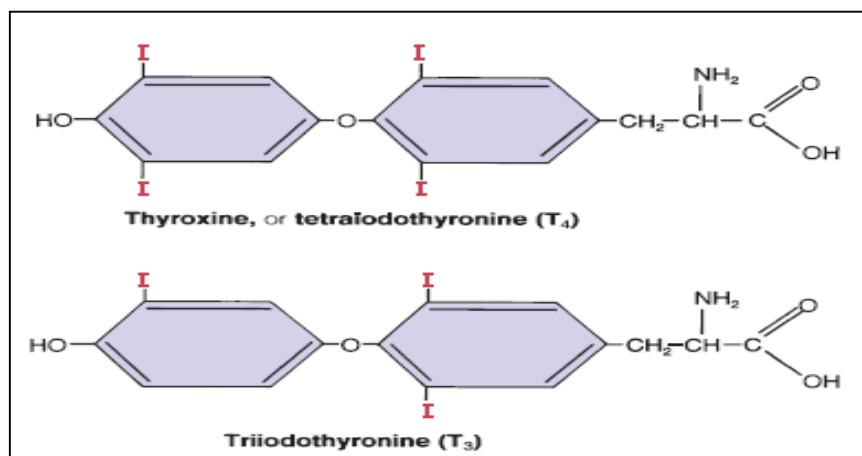


Fig.4 Les hormones thyroïdiennes (**Stuart Ira 2011**)

d- Transport des hormones thyroïdiennes

Plus de 99% des molécules de T₃ et T₄ s'unissent à trois protéines de transport avec une grande affinité, lesquelles sont la globuline liant la thyroxine (TGB), la transthyréline (TTR) et l'albumine (**Dohan et al., 2003 ; Tortora et Derrickson 2006**).

1-3- Mode d'action des hormones thyroïdiennes

La T3 est la forme la plus active biologiquement, elle module l'activité transcriptionnelle des régions régulatrices de ses gènes cibles en se liant à des récepteurs nucléaires spécifiques (TR). En effet, la fixation de complexes (T3-TR) aux éléments de réponse positive (TREp) ou négative (TREN) peut respectivement activer ou réprimer la transcription des gènes cibles et ainsi l'élaboration de l'effet biologique souhaité (**Guissouma et al., 2005**).

1-3-1-Récepteurs des hormones thyroïdiennes

a- Variation génétique

Les récepteurs des hormones thyroïdiennes (TR) sont des récepteurs nucléaires codés par deux gènes distincts *NR1A1* et *NR1A2*, dont l'expression génétique de ces deux gènes donne naissance à plusieurs protéines y compris TR α 1, α 2, α 3 et β 1, β 2, β 3 (**Lazar 1993 ; Williams 2000**).

b- Organisation structurelle des TR

Les TR sont constitués par plusieurs domaines dont le domaine de liaison de l'ADN (DBD, *DNA binding domain*), le domaine de liaison de l'hormone (LBD, *ligand binding domain*) et un ou plusieurs domaines activateurs de la transcription. Les différentes TR se différencient par leurs extrémités amino-terminales alors que leurs DBD et LBD sont conservés (**Lazar 1993**).

c- Distribution tissulaire des TR

Les iso-formes TR α 1 et TR β 1 sont largement exprimés chez les vertébrés. Néanmoins, les iso-formes TR α sont exprimés au cours du développement dans les muscles squelettiques et le tissu adipeux brun. Alors que, les iso-formes TR β 1 sont exprimés majoritairement dans le cerveau et les TR β 2 se trouvent dans l'hypothalamus, l'adéno-hypophyse, l'oreille interne et la rétine (**Hodin et al., 1990 ; Yen 2001 ; Jones et al., 2003**).

1-3-2- Modulation transcriptionnelle des gènes cibles des hormones thyroïdiennes

a- Répression transcriptionnelle des gènes cibles

En l'absence de ligand (T3), les TR hétérodimérisés avec le facteur RXR (Retinoid X receptor) recrutent un complexe multi-protéique corépresseur comprenant notamment des

histones désacétylases (HDAC), responsables du maintien de la chromatine dans un état condensé peu favorable à la transcription (**Fig.5**). D'autres protéines interagissent également avec les cofacteurs de la machinerie transcriptionnelle de base, entraînant ainsi une répression de la transcription du gène cible (**Chen *et al.*, 1999 ; Rosenfeld et Glass 2001**).

b- Activation transcriptionnelle des gènes cibles

La liaison de la T3 aux TR induit leur changement conformationnel, permettant un relargage du complexe corépresseur au bénéfice de complexes co-activateurs comprenant des enzymes de modification des histones de type histone acétyltransférase, des protéines associées aux TR (TRAP) et des protéines interagissant avec le récepteur de la vitamine D (RXR) probablement associées à d'autres co-activateurs interagissant avec la machinerie transcriptionnelle qui comprise l'ARN polymérase II, le facteur associé à TPB (TAF), facteur de transcription (TFIIB) et la protéine de liaison à la boîte TATA (TBP), l'ensemble permettant une activation de la transcription (**Ito et Roeder 2001 ; Yen 2001**).

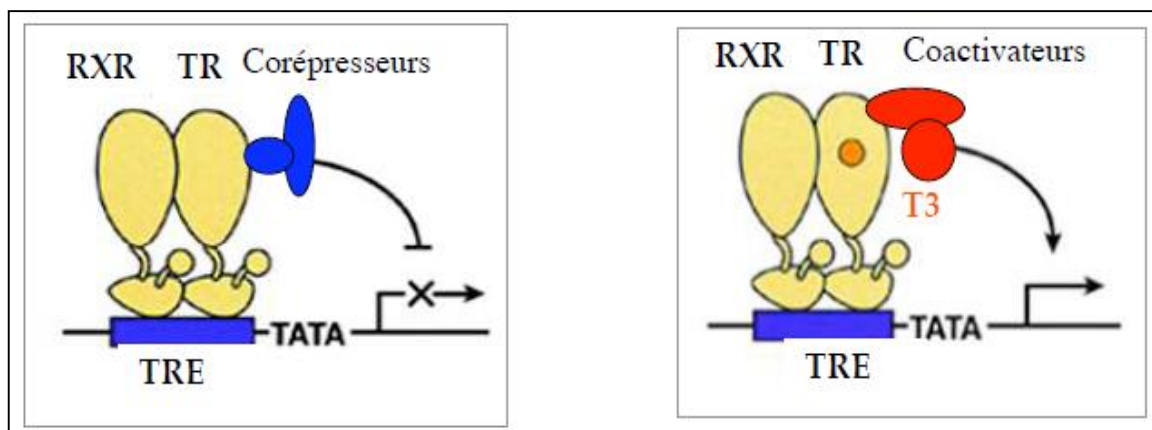


Fig.5 L'activation et la répression transcriptionnelle des gènes cibles par la T3 (**Glass *et al.*, 2000**).

1-1-4- La régulation de la sécrétion des hormones thyroïdiennes

L'importance physiologique des hormones thyroïdiennes nécessite une régulation très fine de leur concentration sanguine (**Fig.6**), elles exercent elles-mêmes un rétrocontrôle négatif sur leur synthèse, au niveau des gènes codants pour des stimulateurs de leur sécrétion par la thyroïde, la TRH dans les noyaux para-ventriculaires de l'hypothalamus et la TSH dans l'hypophyse antérieure (**Stuart Ira 2011**)

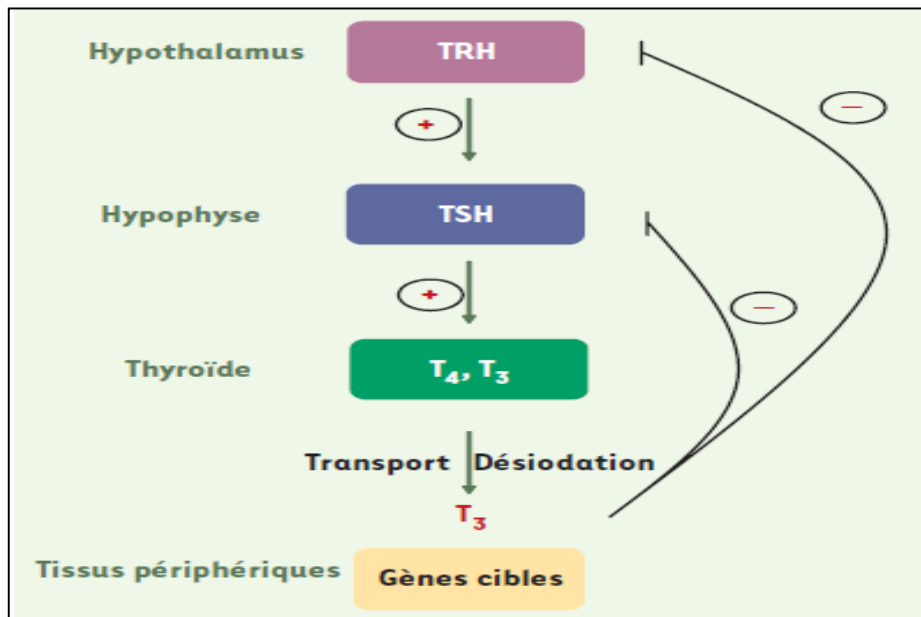


Fig.6 La régulation de la sécrétion des hormones thyroïdiennes (**Guissouma et al., 2005**).

a- L'action stimulatrice de la TRH

La sécrétion des hormones thyroïdiennes est régit principalement par les composantes de l'axe hypothalamo-hypophysaire-thyroïdien. Les cellules neuro-sécrétrices hypothalamiques libèrent la TRH par les boutons terminaux de ces axones en réponse à la sensibilité de ces récepteurs à un stimulus. La TRH passe dans la circulation du système porte hypothalamo-hypophysaire pour être transporté vers les cellules thyrotropes adéno-hypophysaires, où elle stimule la sécrétion de la TSH (**Stuart Ira 2011 ; Tortora et Derrikson 2006**).

b- L'action stimulatrice de la TSH

La TSH se fixe à son récepteur (TSHr) appartenant à la famille des récepteurs transmembranaires G, qui est exprimé au niveau basolatérale de la membrane thyrocytaire (**Fig.7**). Le couplage TSH/TSHr conduit principalement à un couplage de $GS\alpha$ et par conséquent à une activation de l'adénylate cyclase. En effet, l'augmentation de l'AMP cyclique entraîne la phosphorylation de la protéine kinase A et l'activation d'autres cibles, dans le cytosol et le noyau. L'activation de la voie d'adénylate cyclase stimule la transcription du NIS, l'absorption d'iodure, la sécrétion d'hormones thyroïdiennes et la croissance et la différenciation des glandes (**Pirahanchi et al., 2020**).

industriels tels que les perchlorates et thiocyanates, les dioxines, es diphényles poly-chlorés, les phénols. Les métaux lourds tels que le cadmium, le chrome, le plomb, l'arsenic et le cuivre. Les médicaments antithyroïdiens comme le méthimazole, la carbimazole et le propylthiouracile (**Fig.8**). Ces perturbateurs peuvent affecter l'homéostasie thyroïdienne par plusieurs mécanismes y compris, l'inhibition de la capture d'iodures, la fonction du récepteur de la TSH, les fonctions de la TPO et les DIOs, en plus, la liaison aux récepteurs nucléaires des hormones thyroïdiennes et la modification de l'expression des gènes cibles, la liaison aux protéines de transports et l'inhibition du passage des hormones thyroïdiennes aux cellules ainsi que l'augmentation de la l'excrétion de ces hormones (**Boas et al., 2006, Miller et al., 2009 ; Rana 2014 ; Dohan et al., 2003**).

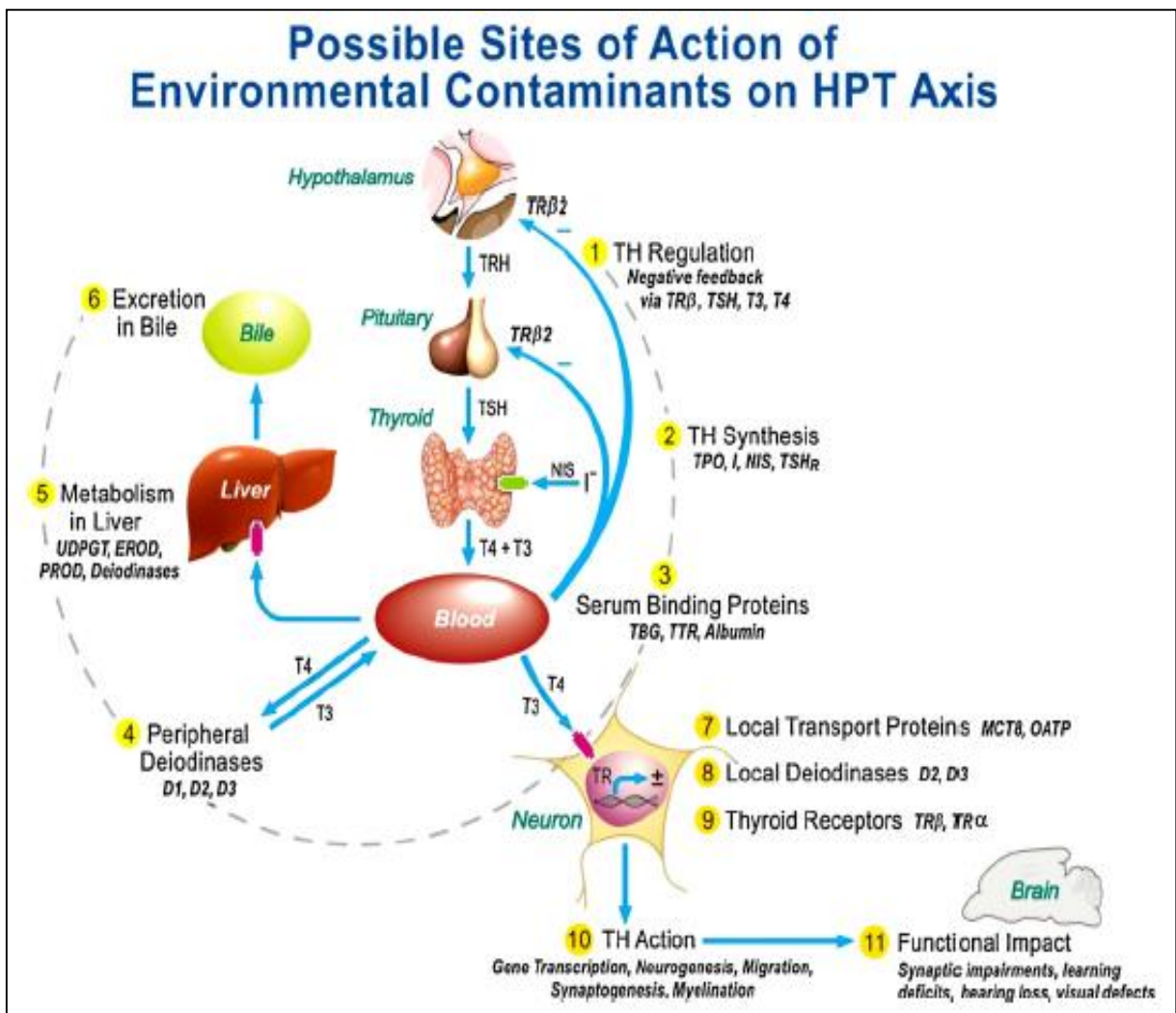


Fig. 8 Les sites d'actions des perturbateurs thyroïdiens (Gilbert et al., 2012)



***CHAPITRE 2: LE CHROME & SES
DERIVES***

2-Le chrome et ses dérivés

2-1-Définition et rappels généraux sur le chrome

Le chrome est un élément métallique naturel appartenant au groupe VI-b selon la classification périodique des éléments chimiques, il se présente dans l'environnement d'une manière ubiquitaire en plusieurs états de valence ; dont les deux formes les plus abondantes sont le chrome trivalent (CrIII) et le chrome hexavalent (CrVI). Le chrome est principalement concentré dans les roches et les sédiments, de façon majeure sous une forme trivalente. Cependant, la forme hexavalente est la plupart du temps introduite dans l'environnement par le biais des activités industrielles et anthropogéniques. Les composés du CrVI sont largement utilisés dans plusieurs industries en raison de leur pouvoir très oxydant, et sont de ce fait rend des agents fortement toxiques pour la santé et l'environnement (**Proctor et al., 2002 ; Oze et al., 2007**).

2-2-Utilisations et sources d'exposition du chrome

Les composés du chrome et surtout la forme hexavalente sont souvent utilisés dans plusieurs industries, dont la décharge inappropriée des effluents et des déchets industriels est considérée comme un contributeur majeur dans la contamination du milieu environnemental, y compris ; l'émission atmosphérique issue de l'industrie chimique, les usines de production de ciment et la combustion des hydrocarbures. La contamination des eaux résulte du dépôt des résidus provenant des installations de décharge des complexes industriels, incluant le tannage du cuir, l'industrie textile et la fabrication des pigments et teintures (**Lauwerys 1999**). En plus, le chrome est impliqué dans la production d'aciers inoxydables et alliages, ainsi que le traitement chimique des métaux. Les utilisations les plus fréquentes de quelques composés du chrome sont citées dans le **tableau 1**.

Tableau 1 : Les utilisations industrielles de quelques composés de chrome (**Losi et al., 1994 ; Barceloux 1999**)

Composés du chrome	Utilisations
Chromate de sodium	Fabrication des composés du chrome.
Dichromate de sodium	Fabrication des composés du chrome, des produits de conservation du bois. Chromage électrolytique. Mordançage des textiles.
Trioxyde de chrome	Chromage électrolytique, production des produits de conservation du bois, des catalyseurs et des pigments.
Dichromate de potassium	Métallurgie et l'électrodéposition de chrome, l'industrie chimique, la fabrication de textile, la conservation de bois, la photographie et les industries d'acier inoxydable de photogravure, et les systèmes de refroidissement.
Dichromate d'ammonium	Fabrication des bandes magnétiques, catalyseurs et pigments. Mordançage des textiles.

2-3- La toxico-cinétique du CrVI

2-3-1- Les voies d'absorption du CrVI

L'exposition aux composés du chrome se fait majoritairement dans les milieux industriels dont le contact avec ces composés est d'une grande pertinence. Les composés hexavalents sont aisément absorbés en raison de leur capacité à traverser les membranes

a- Absorption pulmonaire

Elle dépend de quelques facteurs : l'état de valence, la taille des particules et leur solubilité, l'activité des macrophages alvéolaires. Cependant, les composés solubles du chrome ont une bonne absorption que les particules inhalables (**Barceloux 1999**).

b- Absorption intestinale

Elle se fait par ingestion de la nourriture ou l'eau contaminée par le chrome. Tandis que l'estomac est capable de réduire le CrVI en CrIII, des doses élevées du CrVI sont nécessaires pour qu'un passage sanguin puisse induire des effets toxiques marquants (**Barceloux 1999**).

c- Absorption cutanée

L'exposition aux quantités importante du chrome par voie cutanée peut entrainer une érosion cutanée avancée et les atteintes peuvent être plus aggravées si la peau est déjà lésée. Chez l'homme, le dichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$) ainsi que le chlorure du chrome (Cl_3Cr) peuvent passer à travers la peau (**Barceloux 1999**).

2.3.2 Distribution

Après son absorption, le CrVI est soumis à une cascade de réductions médiée par des réducteurs intracellulaires. En effet, cette réduction résulte en la transformation du CrVI en sa forme trivalente CrIII (**Léonard et Lauwerys 1980**).

À l'intérieur de l'organisme, le CrIII se fixe sur les transferrines plasmatiques et il se distribue dans presque tous les tissus. La capacité de rétention cellulaire ainsi que ces concentrations au niveau tissulaire varie selon la dose et la voie d'exposition. Les reins et le foie sont les cibles primaires de la toxicité des xéno-biotiques à cause de leurs rôles de détoxification et élimination, ainsi, des concentrations importantes du Cr étant trouvées à leurs niveaux. En revanche, le CrVI pénètre dans les érythrocytes en se fixant à la chaîne bêta de l'hémoglobine pour être réduit ultérieurement en CrIII. Ainsi, sa rétention est lente dans l'os lequel est considéré comme un dépôt principal de ce métal lourd. Une fraction absorbée chez la femelle gestante peut être transférer aux fœtus à travers le placenta et au nourrisson à travers le lait pendant la période de la lactation (**Barceloux 1999 ; Sverre et Max 2015**).

2-3-3-Métabolisme

Le métabolisme du CrVI est un mécanisme de protection pour atténuer sa toxicité. Le CrVI est réduit à la forme trivalente peu toxique par le biais de plusieurs systèmes de redox cellulaires enzymatiques et non- enzymatiques en impliquant de nombreuses molécules ayant un pouvoir réducteur puissant tel que l'ascorbate, la cystéine et le glutathion ou bien par des systèmes enzymatiques antioxydants tel que le glutathion réductase et la NADPH cytochrome

C (Zhitkivich 2011 ; Gunaratnam et Grant 2001). La conversion du CrVI en CrIII se fait principalement par deux voies en se basant sur l'abondance des réducteurs intracellulaires (Fig.9). La première se fait via des séries successives de réduction d'un seul électron en produisant des intermédiaires CrV et CrIV. Alors que la deuxième consiste à une réduction de deux électrons en CrVI directement puis une réduction d'un seul électron en CrIII (Barceloux 1999 ; O'Brien *et al.*, 2003).

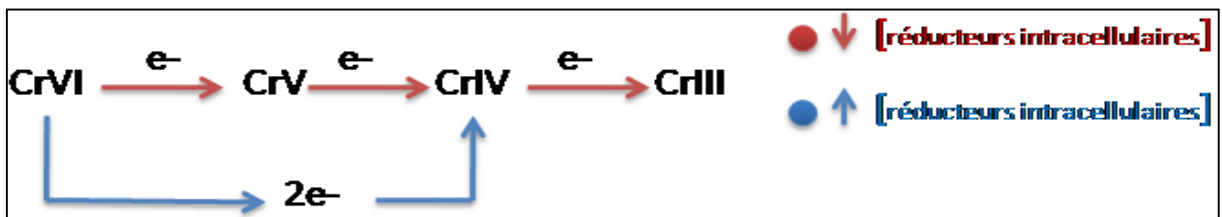


Fig.9 Les deux voies de la réduction intracellulaire du chrome hexavalent

La réduction intracellulaire du CrVI résulte dans la production des intermédiaires du CrV et du CrIV ainsi que des intermédiaires réactives à l'oxygène (ERO), dont ces interactions avec les biomolécules biologiques aboutissent à la détérioration oxydative de ces dernières (Fig.10) et l'induction des altérations aux niveaux cellulaires et tissulaires (Pedraza-Chaverri *et al.*, 2005).

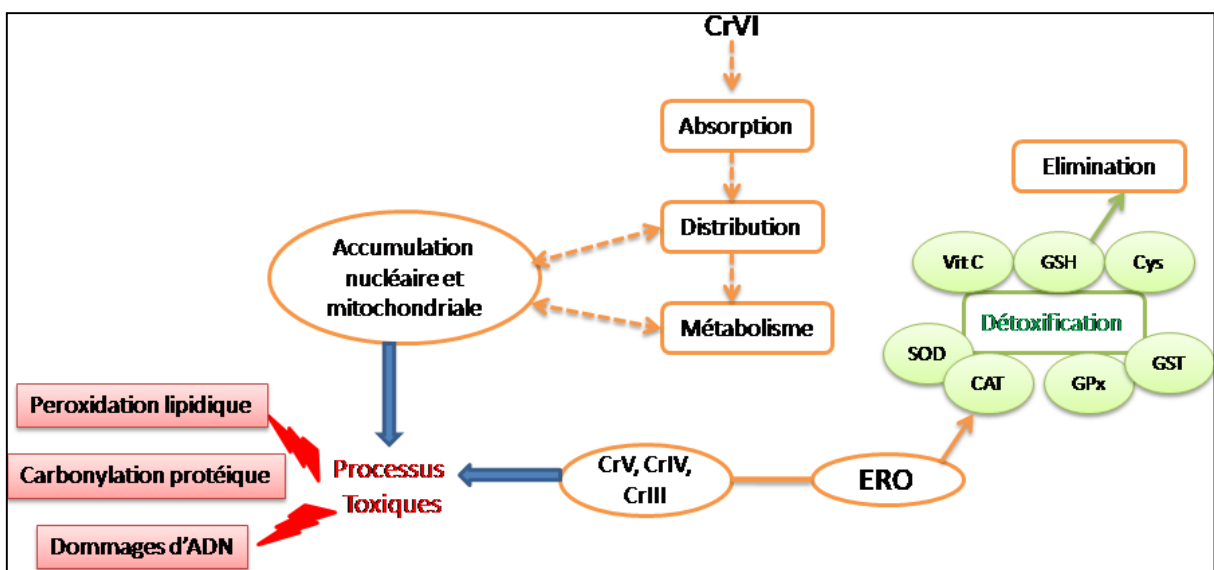


Fig.10 Les principales étapes de la toxicococinétique et toxicodynamique du CrVI par l'organisme (adoptée par Zhitkivich 2011 ; Pedraza-Chaverri *et al.*, 2005).

2-3-4-Elimination

Le chrome est éliminé principalement par l'excrétion urinaire, alors que, l'excrétion biliaire correspond à environ 10 % de l'élimination du chrome. Il peut également être éliminé par transfert sur les cheveux et les ongles (Barceloux, 1999).

2-4-La toxico-dynamique du CrVI

Le mode d'action toxique du CrVI est attribué à son pouvoir oxydant, il est capable de générer des intermédiaires du chrome ainsi que des espèces réactives de l'oxygène (ERO) au cours de son cycle réducteur en perturbant l'homéostasie du statut redox de la cellule cible. En effet, les intermédiaires CrV et CrIV réagissent avec l'ADN et provoquent des effets genotoxiques, mutagènes et cancérogènes, alors que les ERO ont comme conséquence, la peroxydation des lipides membranaires, l'oxydation protéique, des dommages à l'ADN (Fig.11), l'altération de l'expression des gènes ainsi que l'apoptose et l'arrêt de cycle cellulaire (Stohs *et al.*, 2000; Bagchi *et al.*, 2002).

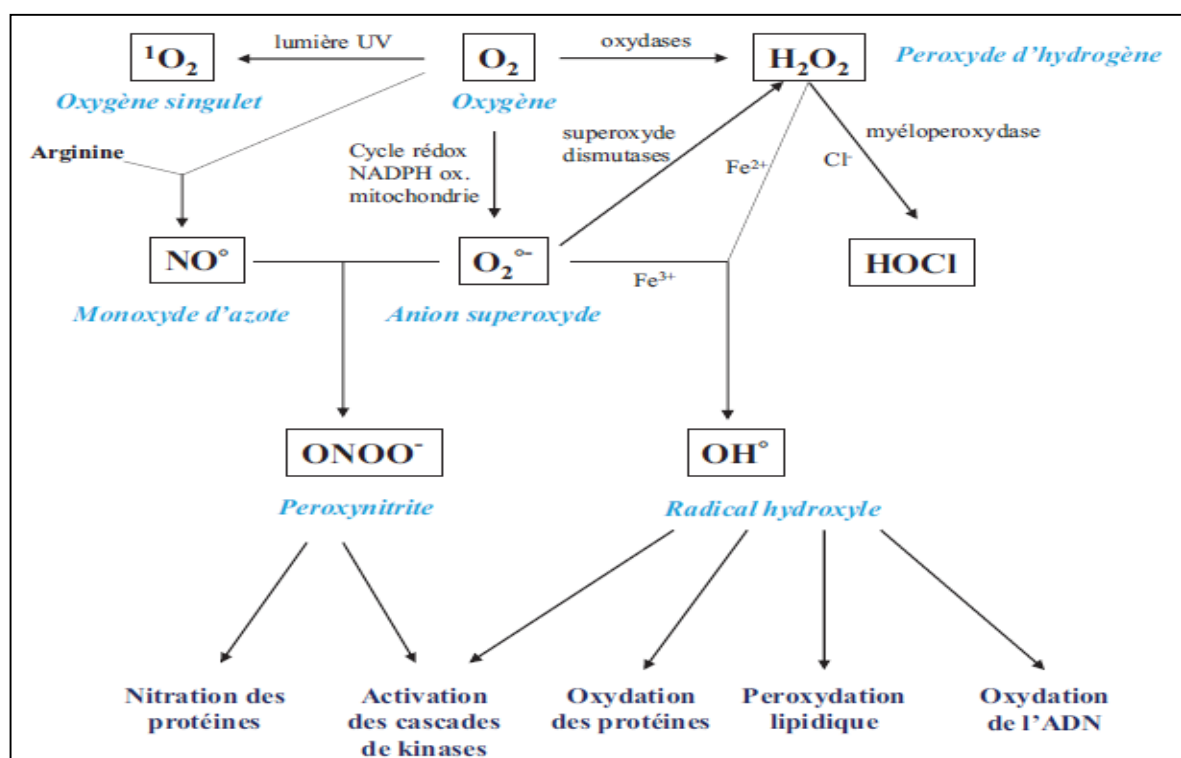


Fig.11 Dommages macromoléculaires par le stress oxydant et nitrique (Favier 2003)

2-5-Processus toxiques du CrVI

Les métaux lourds sont parmi des polluants environnementaux majeurs qui sont impliqués dans l'occurrence de plusieurs maladies comprenant le cancer et les maladies neurodégénératives qui sont associés à la génération du stress oxydant. Le CrVI en particulier est connu par sa capacité d'induire un stress oxydant dans les cellules cibles. En effet, la génération d'espèces réactives d'oxygène (ERO) et d'azote (ERN) dans les systèmes biologiques en excès peut engendrer des dommages oxydatifs des lipides, des protéines et des acides nucléiques en provoquant leurs détériorations structurelles et fonctionnelles (Valko *et al.*, 2005 ; 2006).

2-5-1-Induction de la peroxydation lipidique

L'oxydation des lipides peut altérer l'assemblage, la composition, la structure et la dynamique des membranes cellulaires. Ainsi, l'interaction des ERO et radicaux libres avec les acides gras polyinsaturés et les phospholipides membranaires est responsable de la modification de la fluidité membranaire, le dysfonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs ainsi que les voies de signalisations cellulaires, ce qui conduit à l'initiation de la mort cellulaire (Fig.12). En outre, les peroxydes lipidiques sont considérés comme des médiateurs clés de nombreuses pathologies (Favier 2006 ; Gaschler et Stockwell 2017). Dans le même contexte, les radicaux hydroxyles formés lors de l'inactivation réductive du CrVI sont les initiateurs principaux de la peroxydation lipidique induite lors l'exposition aux composés du CrVI (Stohs 1995 ; Valko *et al.*, 2005). En effet, plusieurs auteurs rapportent que le CrVI a induit la formation des peroxydes lipidiques dans plusieurs tissus (Pedraza-Chaverri *et al.*, 2005 ; Chandra *et al.*, 2007 ; Mary-Momo *et al.*, 2019).

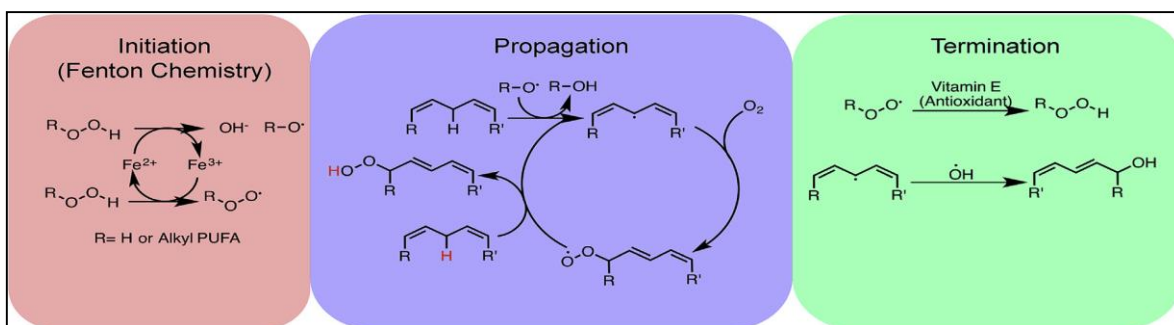


Fig. 12 Mécanisme en chaîne de la peroxydation lipidique (Gaschler et Stockwell 2017).

1-2-5-2-Induction de l'oxydation des protéines

La modification oxydative des protéines est parmi les mécanismes toxiques engendrée par les composés du CrVI, elle peut affecter la transcription de l'ARN messenger ce qui aboutit à la synthèse des protéines déformées (**Holland et al., 2007**). En effet, des études *in vitro* menées par **Petit et al. (2005 ; 2006)** ont démontré que le CrVI a induit la carbonylation et la nitration des protéines cytoplasmiques dans les macrophages humains U937. Dans le même contexte, certaines protéines de choc thermique ainsi que des enzymes glycolytiques ont été carbonylée après l'administration du CrVI dans des cultures des cellules microbiennes *Saccharomyces cerevisiae* (**Sumner et al., 2005**).

2-5-3-Induction de l'apoptose

Il s'agit d'un type de mort cellulaire programmée où l'organisme s'autodétruit à cause des facteurs physiologiques ou pathologiques. Il existe deux principales voies activatrices de la mort apoptotique ; la voie extrinsèque et la voie intrinsèque, cette dernière appelée aussi voie mitochondriale. Dans les deux voies, il en résulte une activation d'un ensemble des caspases initiatrices qui à leur tour activent un ensemble des caspases effectrices (**Poreba et al., 2013**). En plus de stimuli physiologiques, plusieurs stressseurs endogènes ou exogènes peuvent induire l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Ainsi, L'exposition prolongée au CrVI, provoque son accumulation dans plusieurs compartiments cellulaires, y compris le noyau et la mitochondrie (**Ono et al., 1981 ; Alexander et al., 1982**). Le stress oxydant et la génotoxicité semblent être des mécanismes impliqués dans l'apoptose induite par le CrVI incluant, l'implication des kinases activées par le stress, l'activation de la caspase-III, la déplétion du glutathion dans le microenvironnement cellulaire ce qui favorise l'apoptose déclenchée par le pontage ADN-ADN induit par le CrVI, l'élévation de l'expression du cytochrome C et la p53 d'une part et la diminution de l'expression de la Bcl-2 d'autre part (**Fig.13**) (**Singh et al., 1998 ; Banu et al., 2011 ; Bagchi et al., 2001**).

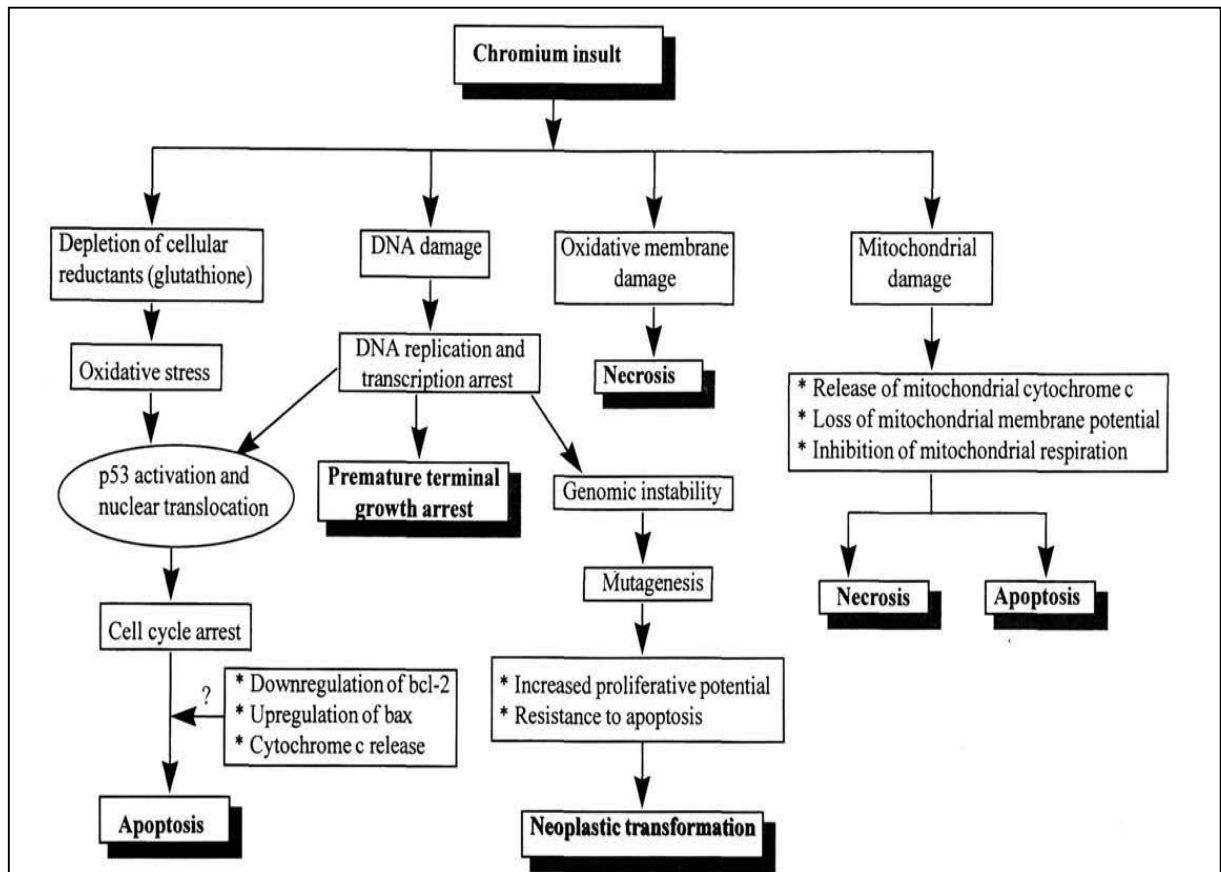


Fig. 13 Mécanismes d'induction de l'apoptose par le CrVI (Singh *et al.*, 1998).

2-5-4-Induction de la génotoxicité, la mutagénicité et la carcinogénicité

Le CrVI est considéré comme un agent génotoxique puissant en raison de sa capacité de s'accumuler au niveau nucléaire, il peut également endommager le matériel génomique par plusieurs processus toxiques par le biais de son potentiel oxydant (Singh *et al.*, 1998). Après la réduction intracellulaire du CrVI, le CrIII interagit avec des acides aminés ligands comme la cystéine et l'histidine pour former des adduits Cr-acide aminé ligand, puis ces complexes interagissent en second lieu avec les groupements phosphate des bases nucléiques pour former les pontages Cr-ADN-protéines (Fig.14). La formation des adduits Cr-ADN ou Cr-ADN-protéines est associée à la mutagénicité du CrVI. En effet, ces adduits provoquent une distorsion de la double hélice causant ainsi des mésappariements lors de la réplication de l'ADN (Zhitkovich *et al.*, 1996; Voitkun 1998).

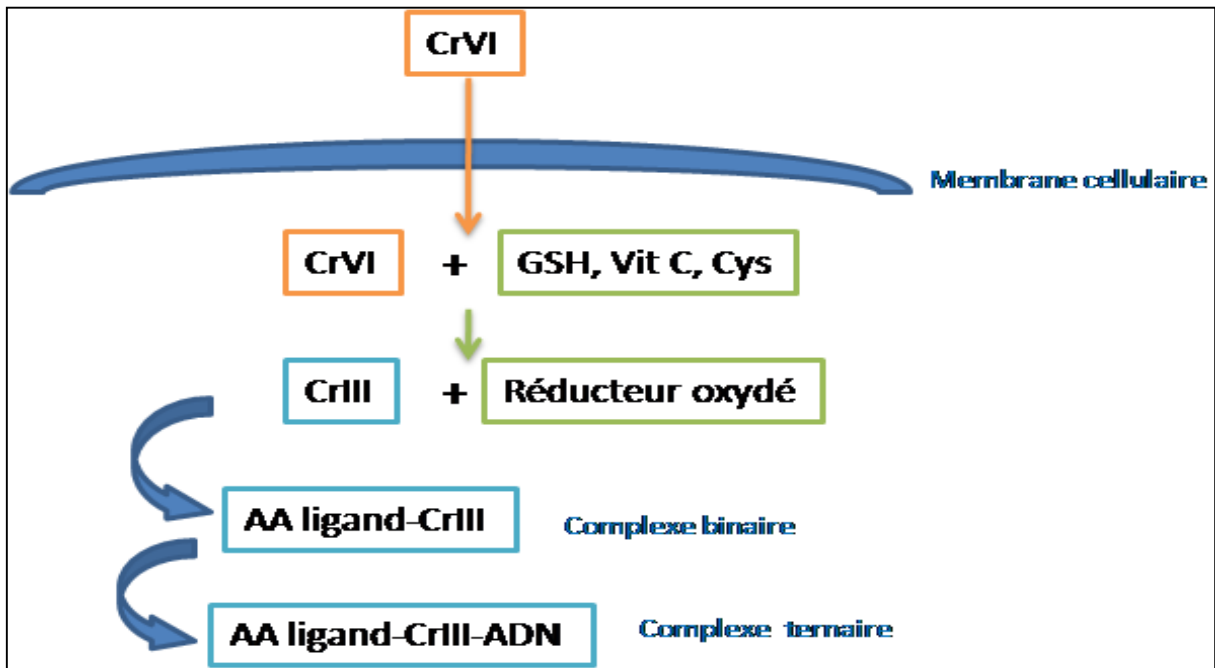


Fig. 14 La formation des adduits Cr-ADN-protéines (adoptée de **Zhitkovich *et al.*, 1996;** **Voitkun 1998**).

1-2-6-La toxicité du CrVI

Les composés hydrosolubles du CrVI sont très toxiques pour les êtres vivants, l'exposition aiguë et même chronique engendre des effets néfastes, parfois irréversibles sur la santé et l'environnement. Bien que, le foie, les reins, la rate et les poumons sont considérés comme des cibles principales du CrVI, les effets délétères de cet élément toxique peuvent comprendre de nombreux autres organes et systèmes, y compris les organes reproducteurs, le système nerveux et même les glandes endocrines (**Wilbur *et al.*, 2012**).

1-2-6-1-Effet hématotoxique du CrVI

Les composés du CrVI ont divers effets toxiques sur les cellules sanguines. Effectivement, une anémie microcytaire, une diminution du nombre de leucocytes et d'érythrocytes avec la transformation de ces dernières en échinocytes ont été rapportés (**Fernandes *et al.*, 1999**). La réduction du CrVI se fait majoritairement par les érythrocytes, ce qui résulte de l'accumulation et la rétention de ces dérivés au niveau érythrocytaire, après le vieillissement des globules rouges, la fraction séquestrée du Cr semble être transférée vers la rate (**Ray 2016**). Ainsi, une érythrocytopenie et une diminution de l'hématocrite et de la concentration d'hémoglobine ont été induits par le CrVI chez les rates *Albinos Wistar* (**Adjroud 2009**). Les

effets cytotoxiques du CrVI comprennent l'oxydation de l'hémoglobine, la déplétion du glutathion et l'inhibition des enzymes anti-oxydantes ce qui provoquent une perturbation irréversible des fonctions cellulaires (**Fernandes *et al.*, 1999 ; Alpoim *et al.*, 1995**). En plus, des altérations histologiques de la rate ainsi que des aberrations chromosomiques dans les cellules de la moelle osseuse ont été détectés après l'exposition à ce métal lourd (**Tarasub *et al.*, 2008**).

2-6-2-Effet hépatotoxique du CrVI

Le foie fait partie des principaux organes cibles des composés du CrVI, car il est impliqué dans le métabolisme et les processus de détoxification de ce métal (**Ben Hamida *et al.*, 2016**). Plusieurs études *in vivo* ont révélé le potentiel hépatotoxique du CrVI caractérisé par un stress oxydatif hépatique, une perturbation des marqueurs de la fonction hépatique et des dommages génomiques (**Soudani *et al.*, 2011 ; Khalaf *et al.*, 2020 ; Ben Hamida *et al.*, 2016 ; Elshazly *et al.*, 2016**). En outre, le CrVI induit un déséquilibre de la biogenèse mitochondriale dans les cellules HepG2 en stimulant les facteurs de transcription de nombreux médiateurs et enzymes anti-oxydantes (**Zhong *et al.*, 2017**).

2-6-3-Effet néphrotoxique du CrVI

En raison de son rôle vital dans la filtration et l'élimination des toxiques, la fonction rénale est sujette à l'action toxique du CrVI. Des études rapportent des modifications structurelles et fonctionnelles importantes induites par les composés du CrVI (**Goodarzi *et al.*, 2017; Patel *et al.*, 2017**). De même, l'exposition orale au $K_2Cr_2O_7$ perturbe le statut redox rénal et induit des lésions tubulaires et glomérulaires. Ainsi, la néphrotoxicité exercée par le $K_2Cr_2O_7$ a été fortement liée à la surproduction de ERO et à l'altération du statut redox rénal (**Soudani *et al.*, 2010; Barrera *et al.*, 2003**). Étant la principale voie d'excrétion du CrVI, ce dernier a la tendance de s'accumuler d'une manière sélective dans le cortex rénal et de provoquer de multiples maladies rénales (**Wedeen et Qian 1991**). De plus, un dysfonctionnement tubulaire et une diminution de la filtration glomérulaire semblent être des facteurs clés dans les lésions rénales induites par le CrVI (**Arreola- Mendoza *et al.*, 2006**). En effet, la perturbation des marqueurs rénaux est un indicateur du dysfonctionnement rénal. Ainsi, l'augmentation des taux plasmatiques d'urée, de créatinine et d'acide urique a été corroborée avec les effets néphrotoxiques des chromates comme il a été rapporté par **Krim *et al.* (2013)**.

2-6-4-Effet neurotoxique du CrVI

Le cerveau est particulièrement vulnérable aux attaques des ERO en raison de sa consommation accrue de l'oxygène. Considérant que le CrVI est un agent oxydant, l'exposition au ce métal lourd peut avoir des effets délétères sur l'intégrité cérébrale. Dans ce contexte, plusieurs études ont rapporté l'effet neurotoxique du CrVI en signalant des dommages oxydatifs cérébraux, des altérations structurelles, ainsi que l'induction des cytokines pro- inflammatoires y compris TNF- α et l'interleukine-6 et les gènes de la voie JAK2/STAT3 (Travacio *et al.*, 2000 ; Mahmoud et Abdel-Twab 2017) dont la dérégulation de cette voie est considérée comme un facteur clé dans le développement des maladies neurodégénératives (Al-Samhari *et al.*, 2014).

2-6-5-La perturbation endocrinienne et la reprotoxicité

Les composés du CrVI sont des perturbateurs endocriniens puissants qui affectent plusieurs axes et glandes endocrines. En effet, il a été signalé que le CrVI provoque un retard ou un arrêt du développement folliculaire ovarien et une diminution des taux d'hormones stéroïdiennes, en induisant une déplétion des enzymes anti-oxydantes dans les cellules de la thèque et la granulosa (Stanely *et al.*, 2013). De même, une diminution des taux sériques de LH et testostérone et une augmentation de la concentration de FSH a été observée par Marouani *et al.* 2012. Chez le mâle, d'autre part dans la même étude, des altérations histologiques de testicules, vésicules séminales et la prostate, une diminution de la motilité et le nombre des spermatozoïdes ainsi que une augmentation des anomalies structurelles des spermatozoïdes ont été rapportés. De plus, la synthèse et la sécrétion des hormones hypophysaires, la prolactine (PRL) et l'hormone de la croissance (GH) ont été diminués après l'exposition au CrVI (Banu *et al.*, 2008).

Par ailleurs, en raison de ses propriétés structurelles et fonctionnelles complexes, la thyroïde est susceptible à l'action toxique du CrVI. En effet, l'altération de l'histoarchitecture et l'hormonogénèse thyroïdiennes, l'induction de dommages oxydatifs, la perturbation de l'expression des ARN messagers codants pour le récepteur TR β et la deiodinase II et III ont été rapportés chez les rats *Wistar* et les embryons des anoues *Bufo gargarizan*. (Hassanin *et al.*, 2013 ; Li *et al.*, 2018).



***CHAPITRE 3: LES OLIGO-
ELEMENTS***

3-Les oligo-éléments

Les oligo-éléments (ou métaux traces) sont des minéraux présents dans les tissus vivants en petites quantités, il existe au moins huit oligo-éléments qui sont considérés essentiels incluant le cobalt, le cuivre, l'iode, le fer, le manganèse, le molybdène, le sélénium et le zinc (**Spears et Engle 2016**). Par ailleurs, les oligo-éléments fonctionnent principalement comme des cofacteurs enzymatiques ; certains ions métalliques, comme le fer et le cuivre, participent aux réactions d'oxydoréduction du métabolisme énergétique. Le fer, en tant qu'un constituant de l'hémoglobine et de la myoglobine, il joue également un rôle essentiel dans le transport de l'oxygène (**Prashanth et al., 2015**). En outre, toutes les enzymes qui participent dans la défense anti-oxydante cellulaire requièrent la présence des oligo-éléments cofacteurs comme le zinc, le sélénium et le cuivre pour maintenir leur activité catalytique (**Garait 2006**).

1-3-1- Le sélénium

1-3-1-1- Importance biologique du sélénium

Le sélénium à faible dose est un oligo-élément nutritif indispensable à la santé humaine et animale, mais il devient toxique à forte dose. Le sélénium exerce son effet biologique à travers plusieurs sélénoprotéines dont il peut y en avoir plus de 30 dans les systèmes mammifères (**Fig.15**). Ces sélénoprotéines comprennent un certain nombre de glutathion peroxydases (GPx), y compris le GPx cellulaire (GPx1) et le GPx spécifique de l'hydroperoxyde de phospholipide (PHGPx; GPx4), l'iodothyronine 5'-déiodinases (IDI), les sélénoprotéines des capsules de spermatozoïdes et la thiorédoxine réductase (**Rayman 2000 ; 2012**).

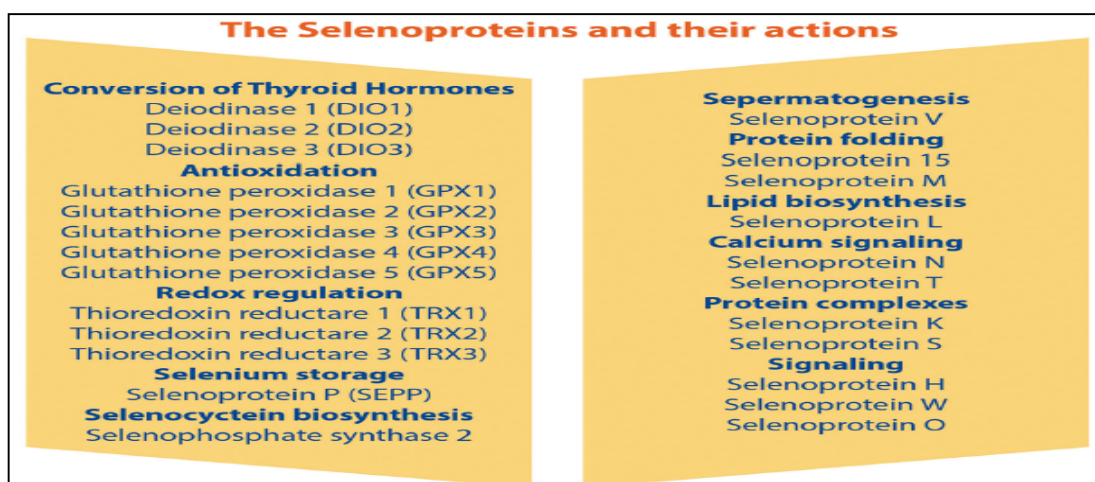


Fig. 15 Les actions des sélénoprotéines dans l'organisme (**Duntas 2020**)

a- Le glutathion peroxydase

Les peroxydases de glutathion (GPx) sont les sélénoprotéines les plus abondantes chez les mammifères, elles appartiennent à une famille d'enzymes possédant des fonctions anti-oxydantes. La famille GPxs comprend huit iso-formes, dont cinq membres ont un résidu SeCys et peuvent catalyser la réduction du peroxyde d'hydrogène et des hydro-péroxydes lipidiques en utilisant le glutathion comme un cofacteur réducteur. Ce groupe comprend le GPx cytosolique ubiquitaire (cGPX, GPx1), le GPx gastro-intestinal (GI-GPx, GPx2), le GPx plasmatique (pGPX, GPx3), le GPx spécifique de l'hydro-péroxyde de phospholipide (PHGPx, GPx4) et le GPx de l'épithélium olfactif (GPx6). Le mécanisme d'action du GPx repose sur l'oxydation des résidus SeCys par le H₂O₂ avec la formation d'acide séléénique, qui est ensuite réduit en séléénolate par les groupements thiols du glutathion (**Roy et al., 2005**)(Fig.16).

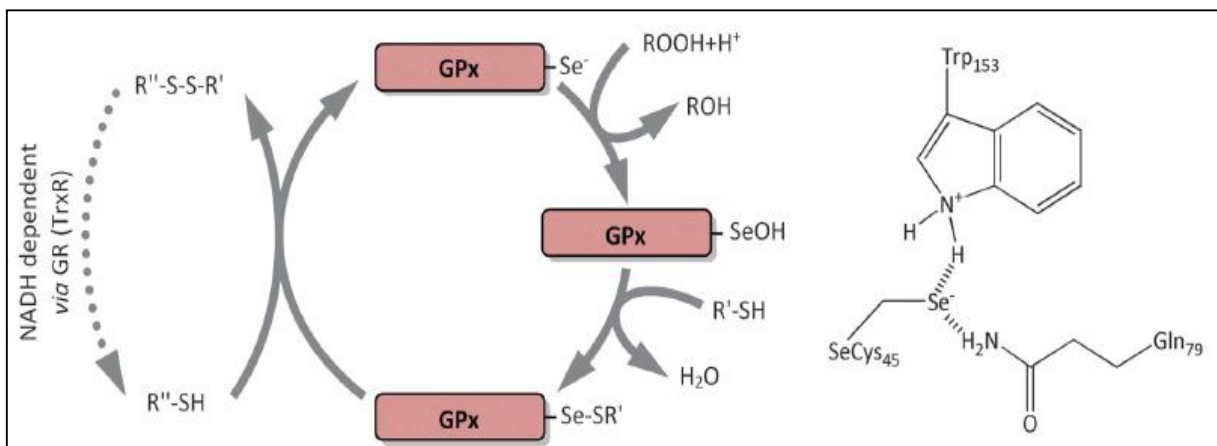


Fig. 16 L'activité catalytique du GPx et site actif de la protéine montrant la triade catalytique (**Roman et al., 2014**).

b- La thiorédoxine réductase

Les thiorédoxine réductases (Trx) sont des oxydoréductases qui, avec la thiorédoxine, constituent le principal système de réduction des disulfures au niveau des cellules. Le sélénium est présent dans le site actif sous forme de groupement séléniol (-SeH) et sert à la protection contre les radicaux libres (**Fig.17**). Trois iso-formes ont été identifiées chez les mammifères: cytosolique (Trx1.), mitochondriale (Trx2) et thiorédoxine glutathion réductase (TGR, Trx3). Ces enzymes sont responsables de la réduction des biomolécules oxydés de faible poids moléculaire, ainsi, elles sont impliquées dans le contrôle de plusieurs processus physiologiques tels que la défense anti-oxydante et le maintien de l'homéostasie redox, la régulation des

facteurs de transcription de la signalisation cellulaire et la réparation de l'ADN (Vyacheslav *et al.*, 2014).

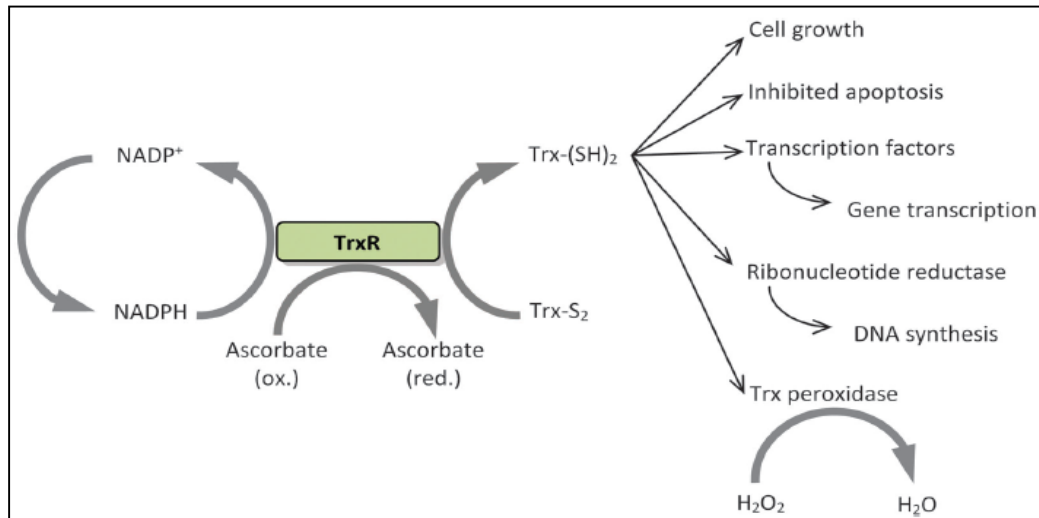


Fig. 17 L'activité catalytique et les fonctions biologiques des TrxR (Roman *et al.*, 2014)

c- Les iodothyronine déiodinases

Les iso-enzymes déiodinases constituent la deuxième famille des sélénoprotéines eucaryotes possédant une fonction enzymatique identifiée. C'est une famille de trois protéines membranaires intégrales de structure similaire. DIO1 et DIO3 sont des protéines de la membrane plasmique, tandis que le DIO2 est localisé dans la membrane du réticulum endoplasmique. Tous les DIO sont des oxydoréductases avec un résidu SeCys dans leur site actif, qui participent au métabolisme des hormones thyroïdiennes en catalysant l'activation (DIO1, DIO2) ou l'inactivation (DIO3) de la tétra-iodothyroxine, de la tri-iodothyronine et de la tri-iodothyronine inverse (Fig.18) (Kôhrle *et al.*, 2005).

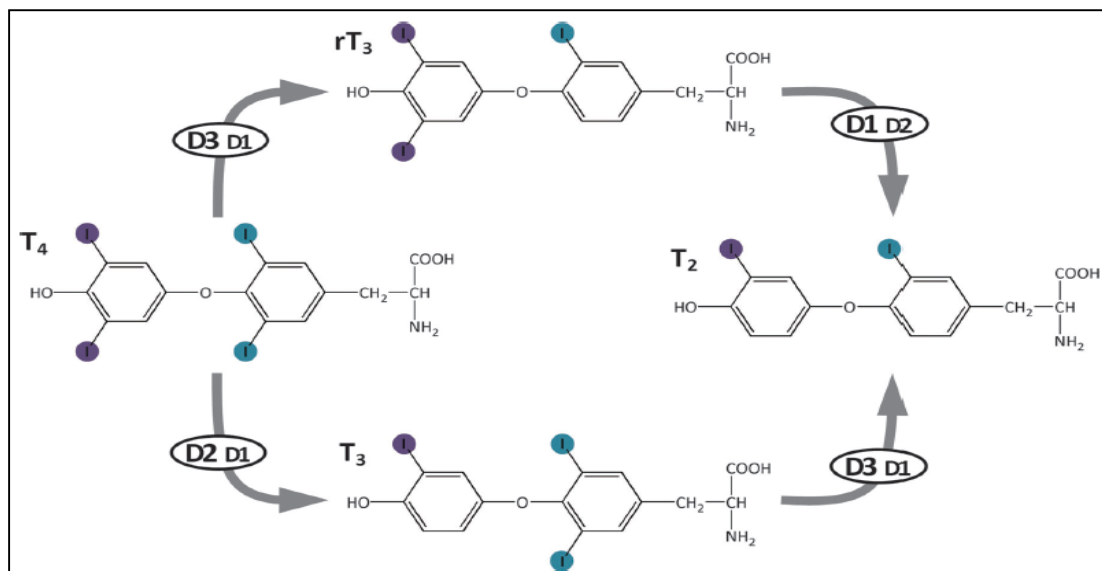


Fig.18 Le métabolisme des hormones thyroïdiennes médiée par les trois iodothyronine déiodinases DIO1, DIO2 et DIO3 (**Roman et al., 2014**).

Les trois DIO présentent des différentes voies d'expression ainsi qu'une distribution tissulaire variée pour chaque iso-enzyme. Le DIO1 s'expriment principalement dans le foie, les reins, les glandes pituitaire et thyroïdienne. Le DIO2 s'exprime dans la thyroïde, le système nerveux central, la glande hypophysaire et les muscles squelettiques. Alors que, le DIO3 est considéré comme une enzyme fœtale en raison de son expression dans les tissus fœtal et néonatal (**Roman et al., 2014**).

Elles assurent plusieurs rôles physiologiques (**Tableau 2**), elles maintiennent l'homéostasie de la T₃ dans les tissus périphériques en contrôlant l'activation/ l'inactivation des hormones thyroïdiennes. En outre, elles favorisent la régénération des muscles squelettiques après blessure. Un autre rôle majeur de la DIO3 dans le placenta, l'utérus et l'embryon/ fœtus est de réguler l'accès des hormones T₃ et T₄ maternelles au fœtus, ce qui lui permet d'avoir le contrôle autonome du processus de différenciation et le développement de l'axe hypothalamo-hypophysio-thyroïdien fœtal (**Larsen et Zavacki 2012**).

Tableau 2 : Rôles physiologiques des trois iodothyronine déiodinases

Système/ rôle physiologique	Deiodinase
L'activation des hormones thyroïdiennes	DIO1, DIO2
Régulation de l'axe H-H-thyroïdien	DIO1, DIO2, DIO3
Développement et différenciation tissulaires	DIO1, DIO2, DIO3
Régénération tissulaire	DIO2, DIO3
Interactions materno-fœtales	DIO2, DIO3
Thermogénèse	DIO2

1-3-1-2- Processus et actions protectifs

a- Action détoxifiante des métaux toxiques

Le sélénium exerce une action antagoniste double contre la toxicité des métaux (**Fig.19**). Premièrement, il est impliqué dans la séquestration/détoxification directe des métaux toxiques tels que l'arsenic et le cadmium en diminuant leur bioaccumulation et en favorisant leur excrétion via la conjugaison avec les espèces organiques du sélénium (**Zwolak et Zaporowska 2012**). Deuxièmement, l'action anti-oxydante des enzymes séléno-dépendantes responsables de la défense cellulaire contre l'attaque radicalaire des ERO (**Xue et al., 2010 ; Messarah et al., 2010 ; El-Sharaky et al., 2007**).

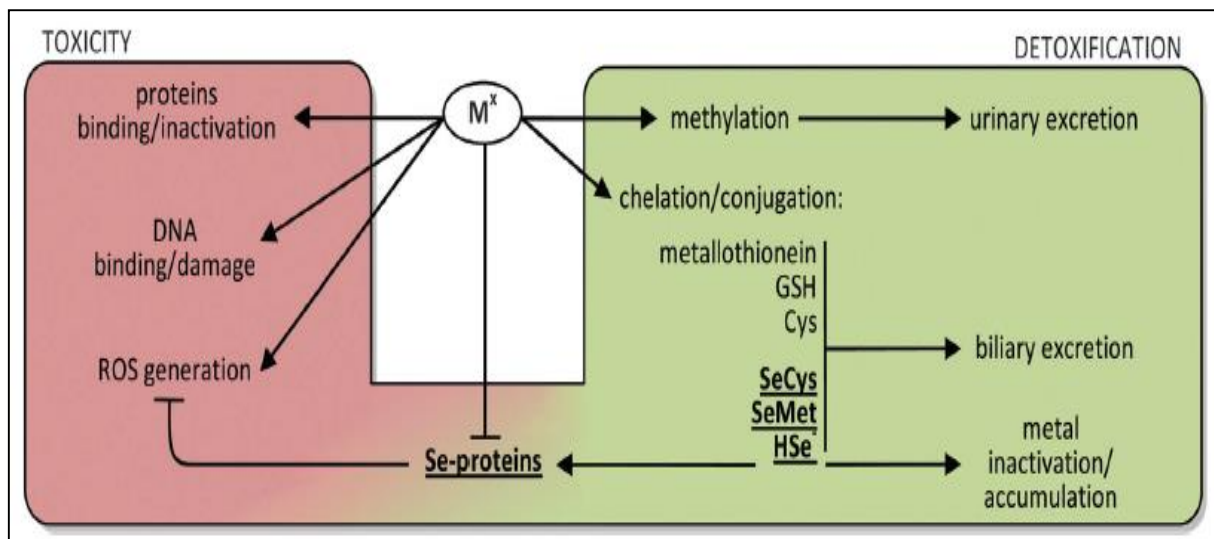


Fig. 19 Processus protecteurs des composés de sélénium contre les effets toxiques des métaux (Roman *et al.*, 2014).

b- Actions anti-oxydante et chemopreventive

L'action anti-oxydante et chemopreventive du sélénium est médiée par les sélénoprotéines impliquées dans la défense cellulaire telles que le glutathion peroxydase et la thiorédoxine réductase (Steinbrenner et Sies 2009; Tapiero *et al.*, 2003). Ces enzymes participent activement dans l'atténuation des dommages radicalaires aux macromolécules lipidiques, protéiques et nucléiques ce qui fournit une protection contre certains cancers et maladies cardiovasculaires (Rayman 2000).

c- Actions genoprotective, anti-cancérigène et anti-métastatique

Le sélénium améliore la réponse aux dommages à l'ADN en augmentant les niveaux d'expression des protéines de réparation de l'ADN. En plus, il a divers mécanismes anticancéreux, tels que la défense anti-oxydante contre la production de ERO, la modification du thiol, la liaison / modification de la chromatine et la protection du génome. Outre ses propriétés anti-cancérigènes, le sélénium a des effets anti-métastatiques en termes de migration cellulaire, d'invasion et d'angiogenèse, en particulier dans les cancers mammaire, colorectal, hépatique, pulmonaire, prostatique et les gliomes cérébraux (Yildiz *et al.*, 2019).

3.2. Le zinc

Le zinc est un oligoélément essentiel à faible dose chez l'homme, il joue un rôle fondamental dans plusieurs processus physiologiques et il participe dans le maintien de l'homéostasie dans l'organisme (Barceloux 1999 ; Betsy *et al.*, 2013).

3-2-1- Effets protecteurs du zinc

a- Action détoxifiante des métaux oxydants

Etant un puissant inducteur de la métallothionéine, le zinc est capable d'atténuer la toxicité des métaux de transition via le système de la métallothionéine en réduisant leur bioaccumulation dans les tissus cibles (Fig.20). Les métallothionéines sont des polypeptides non enzymatiques constituées de 7 atomes de zinc attachés à une chaîne peptidique contient de 60- 68 acides aminée dont la majorité entre eux sont des cystéines avec une teneur élevée en soufre (Bell et Vallee 2009). Les métallothionéines sont considérées comme des protéines de liaisons pour les métaux de transition y compris le zinc, fer, cuivre, plomb, mercure, arsenic et cadmium, ce qui leurs permet de minimiser leur effets toxiques dans l'organisme par trois mécanismes lesquels ; la réduction de leur absorption cellulaire, la séquestration intracellulaire des ions métalliques et l'amélioration de leur élimination en dehors des cellules (Maret 2000).

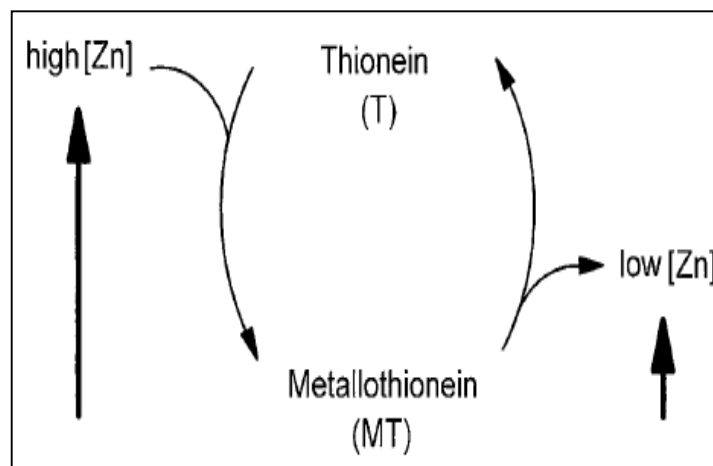


Fig.20 Fonction du couple MT / T pour le maintien de l'homéostasie du zinc (Maret 2000)

b- Action anti-oxydante

L'action anti-oxydante du zinc est attribuée au fait qu'il soit un composant intégral dans la superoxyde dismutase qui représente la première ligne de défense de l'organisme contre les

dommages oxydatifs. Chez l'homme, il existe 3 types de superoxyde dismutases en se basant sur la présence d'un métal central au niveau de l'enzyme : mitochondriale (Mn-SOD), cytosolique (Cu-Zn-SOD) et extracellulaire (Fe-SOD). Le superoxyde dismutase catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en oxygène et peroxyde d'hydrogène qui va être neutralisé par l'action de la catalase ou le glutathion peroxydase (**Fridovich 1986**). En plus, il a été rapporté que le zinc peut augmenter les niveaux cellulaires du glutathion réduit, qui fonctionne comme un tampon redox pour maintenir l'état redox cellulaire (**Santon et al., 2006**).

c- Action anti-apoptotique

L'action anti-apoptotique du zinc repose sur ses propriétés anti-oxydantes ainsi que son induction de la synthèse de la métallothionéine (**Fig.21**). Les ERO sont parmi les médiateurs les plus importants de l'apoptose. En conséquence, l'activité anti-oxydante du zinc comme un cofacteur des superoxydes dismutases demeure un mécanisme clé médiatisé par ce micronutriment pour prévenir l'apoptose. En plus, le zinc est un inducteur puissant de la métallothionéine qui possède une double fonction ; le piégeage des radicaux libres et la détoxification des métaux oxydants notamment le cuivre et le fer. En outre, le zinc joue un rôle important dans le maintien de l'intégrité des membranes cellulaires en protégeant ses composés lipidiques et protéiques contre les dommages induites par les ERO (**Formigari et al., 2007**)

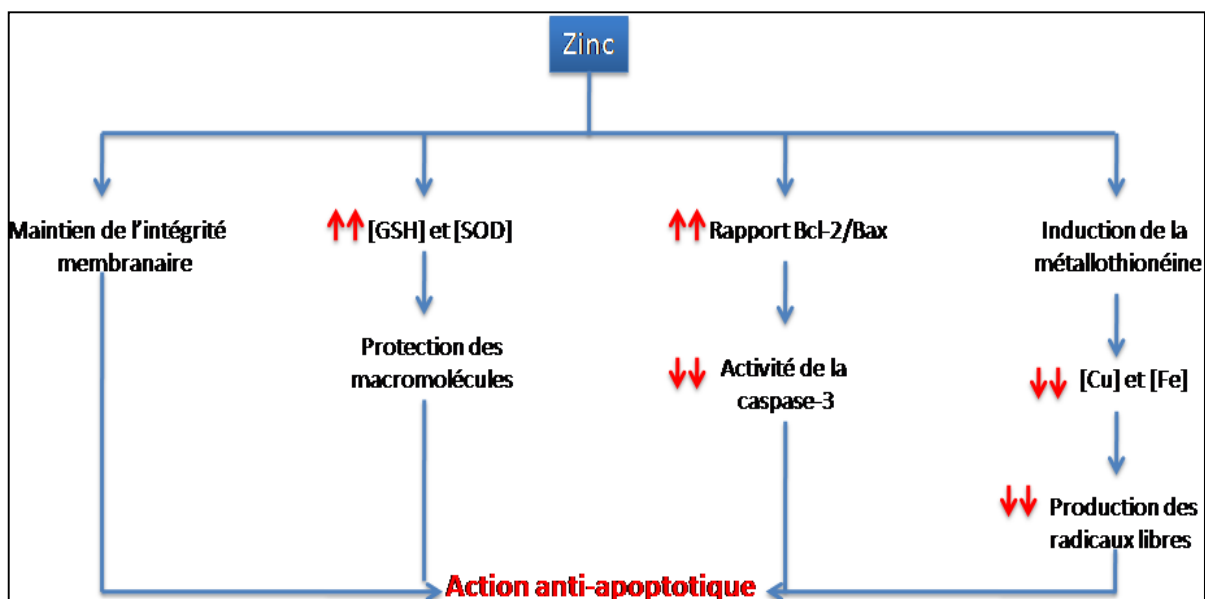


Fig.21 L'action anti-apoptotique du zinc (adoptée par Formigari et al., 2007).

d- Action genoprotective

Le zinc est un composant essentiel pour le maintien de l'intégrité du matériel génétique. En effet, il est indispensable pour de plus de 3000 facteurs de transcription avec des domaines de liaison à l'ADN à doigt de zinc, c'est aussi un cofacteur de plusieurs protéines réparatrices de l'ADN. En plus de son action anti-oxydante, il est impliqué dans la protection des groupements sulfhydriles des protéines structurales et réparatrices de l'ADN contre l'oxydation. En outre, il joue un rôle prédominant dans la régulation de l'expression génétique via les facteurs de transcription à doigts de zinc (Ho *et al.*, 2003 ; Witkiewicz-Kucharczyk et Bal 2006).

e- Actions anti- cancérigène et anti-tumorale

L'action anti-carcinogène du zinc demeure dans le maintien de l'intégrité des systèmes de réparation par excision de bases (BER) et nucléotides (NER) qui régulent les interactions protéine-protéine et protéine- acide nucléique ; ces systèmes de réparation génomique sont susceptibles aux substances carcinogéniques et même les substances oxydatives endogènes. En outre, le zinc active la voie de la p53 (Fig.22) ; une protéine suppressive de tumeur qui exerce un effet anti-oncogène en stimulant la réparation de l'ADN avant la cytokinèse pour lutter contre la formation des cellules tumorales (Yildiz *et al.*, 2019).

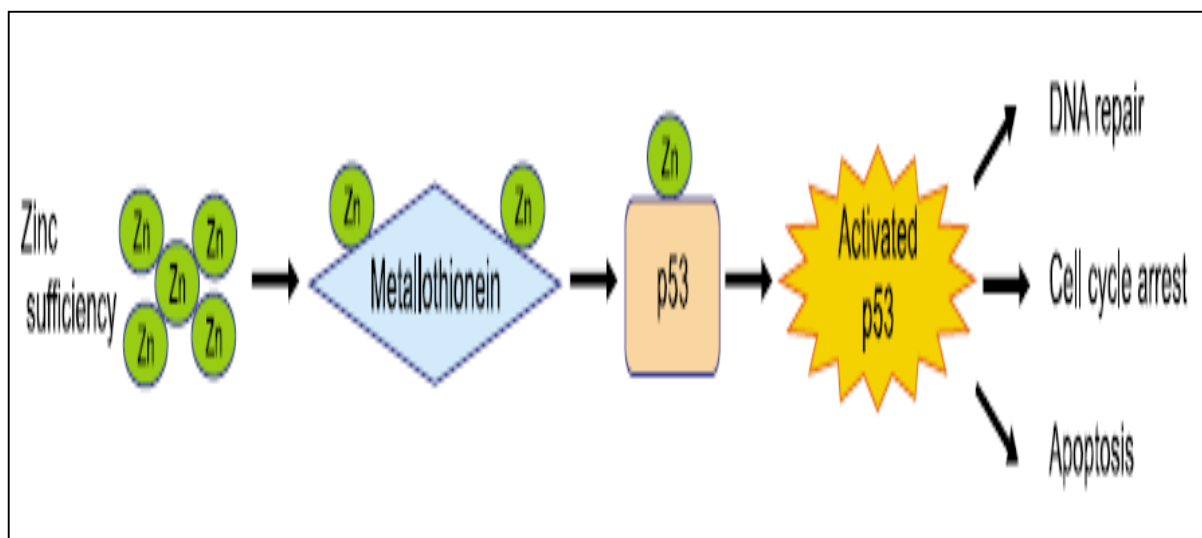


Fig.22 L'implication du zinc dans l'activation de la voie de la p53 (Yildiz *et al.*, 2019)



OBJECTIFS DU TRAVAIL

Objectifs du travail

A la lumière de ces données bibliographiques, notre objectif comporte les 12 volets suivants :

- **1^{er} volet** : l'utilisation des doses croissantes du $K_2Cr_2O_7$ et la détermination de la dose toxique en se basant sur :
Une évaluation du poids corporel maternel et du poids thyroïdien absolu et relatif des rates gestantes traitées par des doses croissantes du dichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$).
- **2^{ème} volet** : une évaluation des concentrations plasmatiques en T3, T4 et TSH des rates gestantes traitées par des doses croissantes du $K_2Cr_2O_7$.
- **3^{ème} volet** : une examination microscopique de l'histoarchitecture de la glande thyroïdienne des rates gestantes traitées par des doses croissantes du $K_2Cr_2O_7$.
- **4^{ème} volet** : recherche des éventuels effets protecteurs du Se et du Zn contre l'effet toxique induit par le $K_2Cr_2O_7$ sur la détermination du poids corporel maternel et du poids thyroïdien absolu et relatif des rates gestantes co-traitées par le $K_2Cr_2O_7$ en association avec le Se, le Zn, ou les deux simultanément sur la glande thyroïdienne chez les rates gestantes.
- **5^{ème} volet** : recherche des éventuels effets protecteurs du Se et du Zn contre l'effet toxique induit par le $K_2Cr_2O_7$ sur la détermination des concentrations plasmatiques en T3, T4 et TSH des rates gestantes co-traitées par le $K_2Cr_2O_7$ en association avec le Se, le Zn, ou les deux simultanément.
- **6^{ème} volet** : recherche des éventuels effets protecteurs du Se et du Zn contre l'effet toxique induit par le $K_2Cr_2O_7$ sur l'histoarchitecture de la glande thyroïdienne des rates gestantes co-traitées par le $K_2Cr_2O_7$ en association avec le Se, le Zn, ou les deux simultanément.
- **7^{ème} volet** : recherche des éventuels effets protecteurs du Se et du Zn contre l'effet toxique induit par le $K_2Cr_2O_7$ sur la bioaccumulation du Cr dans la thyroïde des rates

- gestantes co-traitées par le $K_2Cr_2O_7$ en association avec le Se, le Zn, ou les deux simultanément.
- **8^{ème} volet** : recherche des éventuels effets protecteurs du Se et du Zn contre l'effet toxique induit par le $K_2Cr_2O_7$ sur la détermination des taux de bio-marqueurs de la peroxydation lipidique et la carbonylation protéique dans la thyroïde des rates co-traitées par le $K_2Cr_2O_7$ en association avec le Se, le Zn, ou les deux simultanément.
 - **9^{ème} volet** : recherche des éventuels effets protecteurs du Se et du Zn contre l'effet toxique induit par le $K_2Cr_2O_7$ sur la détermination des activités des enzymes anti-oxydantes incluant le SOD, la CAT, le GPx, le GST au niveau de la thyroïde des rates co-traitées par le $K_2Cr_2O_7$ en association avec le Se, le Zn, ou les deux simultanément.
 - **10^{ème} volet** : l'estimation du taux de l'apoptose par la voie de la caspase-3 dans la thyroïde des rates co-traitées par le $K_2Cr_2O_7$ en association avec le Se, le Zn, ou les deux simultanément.
 - **11^{ème} volet** : une évaluation de la fragmentation d'ADN dans la thyroïde et la moelle osseuse des rates co-traitées par le $K_2Cr_2O_7$ en association avec le Se, le Zn, ou les deux simultanément.
 - **12^{ème} volet** : la détermination de la cytotoxicité et la formation des micronoyaux dans la moelle osseuse des rates co-traitées par le $K_2Cr_2O_7$ en association avec le Se, le Zn, ou les deux simultanément.



***PARTIE
EXPERIMENTALE***



***MATERIEL
& METHODES***

1-Matériel et méthodes

1-1- Matériel

1-1-1- Animaux

Les rates femelles de la souche *Albinos Wistar* proviennent de l'institut Pasteur (Alger, Algérie), elles pèsent environ 180- 250 grammes et sont âgées de dix semaines au début de l'expérimentation.

Les rates sont hébergées au sein de l'animalerie du laboratoire de Physiotoxicologie Cellulaires et Moléculaires- Biomolécules (LPTPCMB) Université Batna2. Dans cette étude, nous avons utilisé soixante- douze rates *Albinos Wistar*. Elles sont soumises à une période de deux semaines d'adaptation aux conditions de l'animalerie ; à un cycle lumière/ obscurité de 12 h/ 12 h et une température de $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Elles sont logées dans des cages spécialisées en polypropylène qui possèdent des couvercles en acier inox et tapissées d'une litière constituée des copeaux en bois. Les animaux sont abreuvés et nourris *ad libitum* avec un aliment granulé standard des rongeurs (**Tableau 3**) provenant d'ONAB (Bejaia, Algérie). Les rates sont mises en cage avec des rats mâles pendant la nuit. Le matin, les rates ayant un frottis vaginal positif sont considérées en jour zéro de la gestation dont la durée moyenne de la gestation est de 21 jours approximativement (**Adjroud 1995**).

Tableau3 : Composition de la formule alimentaire de l'aliment (%).

Nutriments	Pourcentage (%)
Maïs	9.5
Orge	13
Son de blé	21
Luzerne	44
Tourteau de soja	8
Calcaire	2
Phosphate bi-calcique	1.5
CMV (complément minéral vitaminé)	1
Total	100

1-1-2- Produits chimiques et réactifs

Les produits chimiques et les réactifs utilisés pendant l'expérimentation sont les suivants :

- Le dichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$), le chlorure de zinc ($ZnCl_2$) et le sélénium (Se) proviennent de Sigma Aldrich (Chemie GmbH, Taufkirchen, Allemagne).
- le Diméthylsulfoxyde (DMSO) provient de Sharlau (Barcelone, Espagne)
- L'EDTA et l'éthyle-acétate proviennent de Thermo Fisher Scientific (Strasbourg, France).
- La solution de l'albumine sérique bovine (BSA), le nitrobluetetrazolium (NBT), la riboflavine, la méthionine, le guanidine hydrochloride, NaOH, le Triton X- 100, le formol, la paraffine, l'éthanol pure, l'xylène, l'éosine et l'hématoxyline, l'acide nitrique 69% et l'acide chlorhydrique 37% Suprapur[®] proviennent de Merck KGaA (Darmstadt, Allemagne).
- L'acide thiobarbiurique (TBA), l'acide trichloroacétique (TCA), Tris- HCl, l'acide acétique glacial, Le Dodécyl Sulfate de Sodium (SDS), le tampon de phosphate en solution (PBS), le peroxyde d'hydrogène en solution, le glutathion réduit, le 5, 5-dithiobis- 2- nitrobenzoicacid (DTNB), le 1- Chloro- 2, 4- dinitrobenzene (CDNB), le 2, 4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) et le bromure d'éthidium (BET), sont fournis par Sigma Aldrich (Steinheim, Allemagne). L'agarose à bas point de fusion (LMA) et l'agarose à point de fusion normal (NMA) sont de la part de Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA).
- Le 1-Butanol et la pyridine ont été fournis par BDH- Prolabo (Fontenay- sous bois, France) et la solution de Bradford provient de Bio-Rad (California, USA).
- Solution standard du chrome (2% HNO_3 , 1000 mg/ l) de la part de PerkinElmer Pure, France.

1-2- Méthodes

1-2-1- Traitements des rates

Dans cette étude nous avons utilisé 72 rates adultes au 3^{ème} jour de la gestation durant la période de la pré-implantation, réparties en 7 groupes différents, les rates sont anesthésiées avec de l'éther di-éthylique puis pesées et reçoivent par voie sous-cutanée les différents traitements selon le protocole suivant (Fig.23).

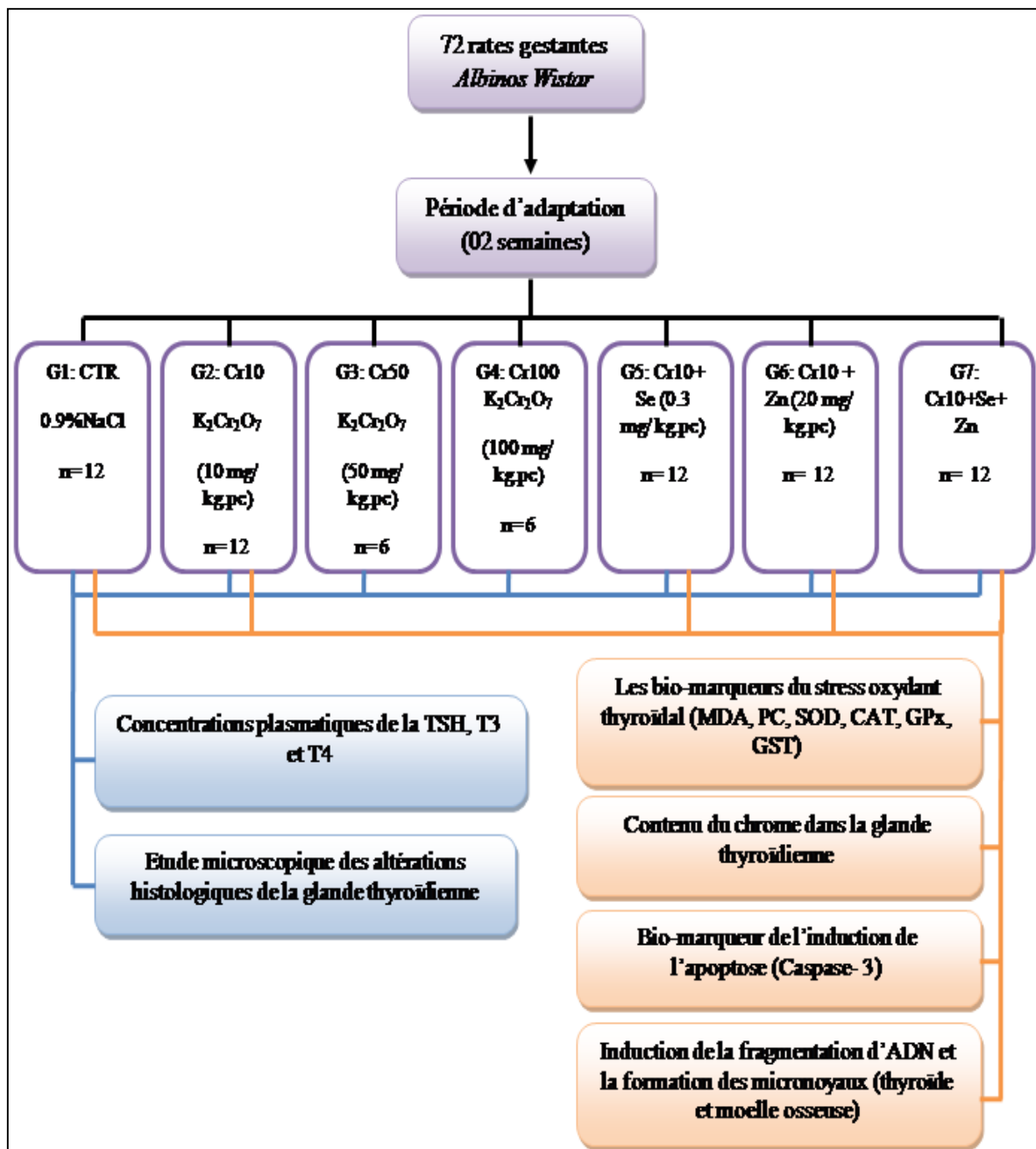


Fig. 23 Répartition des groupes et protocole expérimental

Les doses de $K_2Cr_2O_7$ et de Se sont choisies en se basant sur les résultats des études précédentes (Adjroud 2009, 2010 ; Käkälä *et al.*, 1999), et celle du $ZnCl_2$ selon les résultats des travaux de Paksy *et al.* 1996 ; Nasiry Zarrin Ghabaee *et al.* 2017.

1-2-2- Prélèvements des tissus

1-2-2-1- Prélèvement du sang

- Le prélèvement du sang est effectué au 6^{ème} et au 20^{ème} jour de la gestation à partir de la veine jugulaire.
- Le sang prélevé dans des tubes à hémolyse héparinés est immédiatement centrifugé à + 4° C à raison de $1500 \times g$ par 15 min.
- Le plasma récupéré est stocké dans des tubes eppendorf et conservé à - 20 °C jusqu'à son utilisation pour les dosages des hormones thyroïdiennes T3, T4 et la TSH.

1-2-2-2- Prélèvement de la glande thyroïdienne

- Au 20^{ème} jour de la gestation, la glande thyroïdienne est prélevée chez la rate pré-implantée selon le protocole de Hadie *et al* (2013).
- La thyroïde est délicatement détachée de la trachée et rincée avec de l'eau physiologique puis et pesée et
- Les fragments de la thyroïde sont conservés soit dans du formol à 10 % pour la réalisation de l'étude histologique, soit stockée à - 20 °C pour la quantification des bio-marqueurs du stress oxydatif, l'apoptose et la génotoxicité.

1-2-2-3- Prélèvement de la moelle osseuse

- Les membres postérieurs des rates sont détachés et décharnés.
- Les fémurs sont prélevés
- Les extrémités fémorales sont coupées pour libérer la moelle osseuse.

1-2-3- L'évaluation du poids corporel et thyroïdien

Les rates sont pesées avant chaque manipulation. En plus, le poids de la glande thyroïdienne a été pris après la dissection et l'indice thyro- somatique a été calculé par l'équation suivante :

$$\text{Indice thyro- somatique (\%)} = \text{poids absolu de la thyroïde} \times 100 / \text{poids corporel}$$

1-2-4- Le dosage des hormones thyroïdiennes

Elle est réalisée par la technique électro-chimiluminescence (ECL) en utilisant des kits et l'automate analyseur Roche Cobas ((Elecsys® and Cobas E411 analyzers, Roche Diagnostics, Allemagne) (**Tableau 4**).

Tableau 4 : Des informations sur la performance des immunodosages Elecsys® TSH, T4 et T3

	TSH	T4	T3
Durée du test	18 min		
Volume d'échantillon	50 µl	15 µl	15 µl
Limite de détection	0,005 µUI/ml	0.5 pmol/ l	0.6 pmol/ l
Domaine de mesure	0.005- 100 µUI/ ml	0.3- 100 pmol/ l	0.4- 50 pmol/ l
Limite de précision intermédiaire	1.8- 8.7 %	1.8- 7.6 %	1.9- 8.2 %

Les informations de la performance des essais hormonaux ont été évoquées des extraits des fiches techniques d'Elecsys® TSH, T4 et T3.

1-2-4-1- La quantification des concentrations plasmatiques en T3 et T4

Le principe de cette technique est par compétition. L'essai comporte deux incubations successives,

a- La première incubation

Elle sert à incuber l'échantillon plasmatique avec des anticorps spécifiques anti-T3 ou anti-T4 liés avec un complexe de ruthénium.

b- La deuxième incubation

Elle sert à occuper les sites de liaison restants libres sur l'anticorps labelé ; en ajoutant la T3 ou la T4 biotinylées de microparticules recouvertes par la streptavidine. Ce qui aboutit à la formation du complexe anticorps- haptène, ce dernier est liée à la phase solide grâce à l'interaction biotine- streptavidine (**Fig.24**).

La préparation réactionnelle finale est aspirée vers la cellule de mesure qui est liée à une électrode. Une tension appliquée à l'électrode va induire une émission chimiluminescente qui va être mesurée par un photomultiplicateur. L'intensité de cette émission est inversement proportionnelle à la concentration de la T3 ou T4 présente dans l'échantillon. Les résultats sont déterminés à l'aide d'une courbe d'étalonnage spécifique fournis par le code barres du kit.

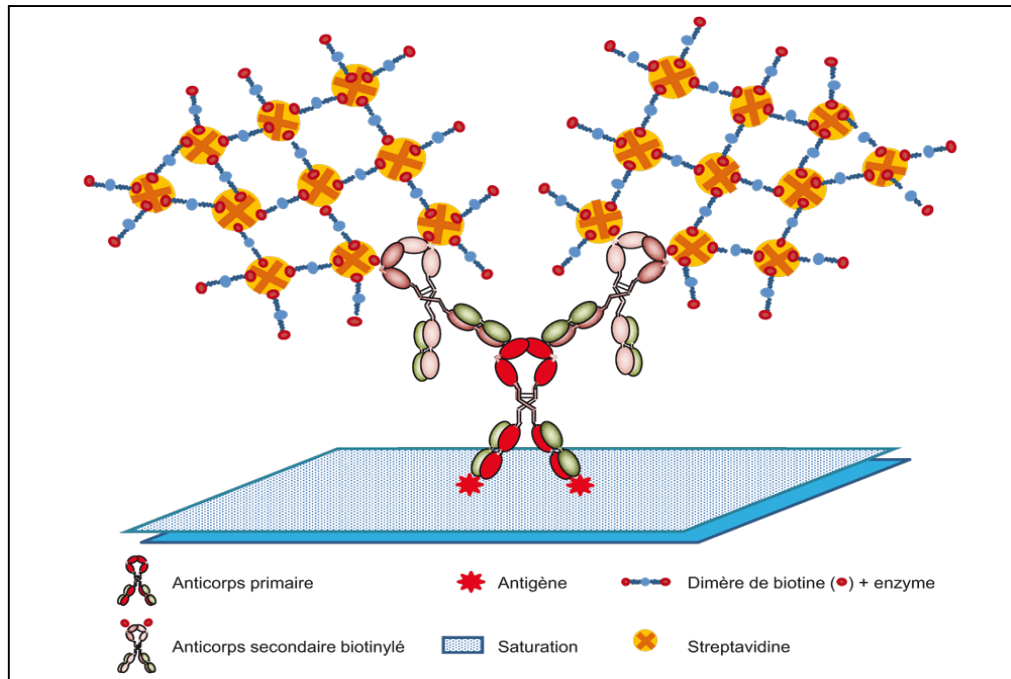


Fig.24 Représentation schématique du système d'amplification du complexe avidine-biotine (ASSIM 2020).

1-2-4-2- La quantification des concentrations plasmatiques en TSH

La mesure de la concentration plasmatique de l'hormone adéno-hypophysaire TSH est basée sur un immunodosage de type sandwich et elle comporte deux incubations successives,

a- La première incubation

L'échantillon est incubé avec deux anticorps anti- TSH monoclonaux, le premier est biotinylé et le deuxième est attaché à un complexe de ruthénium, ce dernier est utilisé comme un marqueur.

b- La deuxième incubation

La TSH à doser et les deux anticorps réagissent et forment un complexe sandwich après la deuxième incubation avec les microparticules enrobées avec la streptavidine. Par conséquent, l'interaction biotine- streptavidine assure l'attachement du complexe réactionnel à la phase solide. Puis, le mélange est aspiré par la cellule de mesure. L'émission chimiluminescente qui suit l'application d'un voltage à l'électrode est directement proportionnelle à la concentration de la TSH présente dans l'échantillon. Les résultats sont déterminés à l'aide d'une courbe d'étalonnage spécifique fournis par le code barres du kit.

1-2-5- l'étude histologique

1-2-5-1- Principe

L'histologie de la glande thyroïdienne est effectuée selon la technique dite standard en se référant à la procédure décrite par **Bancroft et Gamble 2008**, elle consiste également à la préparation des coupes tissulaires minces et colorées par l'éosine et l'hématoxyline pour les rendre observables au microscope optique afin d'examiner l'histoarchitecture cellulaire et détecter les altérations.

1-2-5-2- Mode opératoire

Cette procédure requière plusieurs étapes successives ; après la fixation dans le formol à 10 %, la glande thyroïde subit les traitements suivants

a- Inclusion

L'inclusion comporte trois étapes majeures :

- 1- La déshydratation
- 2- L'éclaircissement ou la dés-alcoolisation
- 3- L'imprégnation ou paraffinage.

Le but est d'éliminer tous le contenu de l'eau du tissu par imprégner l'échantillon dans l'alcool absolu (déshydratation) puis chasser l'alcool en utilisant le toluène (dés- alcoolisation) pour rendre la pièce translucide.

Après rinçage à l'eau distillée, les cassettes contenant les échantillons sont placées 24 heures dans l'automate qui comporte des bains d'alcool éthylique de concentration croissante (70 %, 95 % et 100 %), un bain de toluène et un bain mixte toluène/ paraffine.

L'imprégnation des échantillons dans la paraffine fondue à 56 °C pendant 24 heures pour que tous les espaces libres de l'échantillon soient remplis par la paraffine. Puis, afin de former des blocs, une petite quantité de paraffine pure et fondue est versée dans des moules spéciaux en alliage métallique placées sur une plaque à température ambiante, après avoir mis la cassette contenant l'échantillon, la paraffine fondue est versée une deuxième fois jusqu'à ce que le

moule soit bien rempli. Enfin, les moules sont posés sur la plaque refroidissante pour la solidification afin de faciliter la coupe et obtenir des rubans paraffinés de meilleure qualité.

b- La coupe et l'étalement

Les fragments inclus sont débités en coupe aussi fine que possible à l'aide d'un microtome permettant de réaliser des coupes de 5 μm d'épaisseur. Les rubans de paraffine renfermant les coupes des échantillons sont placés dans un bain Marie à 37 °C afin d'éliminer tous les plis, ces rubans sont ensuite étalés sur des lames enduites préalablement de la solution de Mayar qui contient des volumes équivalents de l'albumine et la glycérine. Les lames sont légèrement chauffées sur une plaque chauffante pour une meilleure adhésion.

c- Déparaffinage, coloration, réhydratation

- Déparaffinage

Les lames sont déparaffinées et réhydratées en les plaçant dans des bains contenant le xylène, l'éthanol à des concentrations décroissantes et l'eau distillée (**Fig.25**).

- Coloration des lames

Le principe de la coloration repose sur l'affinité particulière de certains constituants cellulaires pour des colorants vitaux notamment l'hématoxyline et l'éosine. L'hématoxyline permet de mettre en évidence le noyau alors que l'éosine permet de mettre en évidence le cytoplasme (**Fig.25**).

- Déshydratation

Enfin, une déshydratation et un éclaircissement ont été subits par submerger les lames dans des bains d'éthanol et de l'xylène respectivement (**Fig.25**).

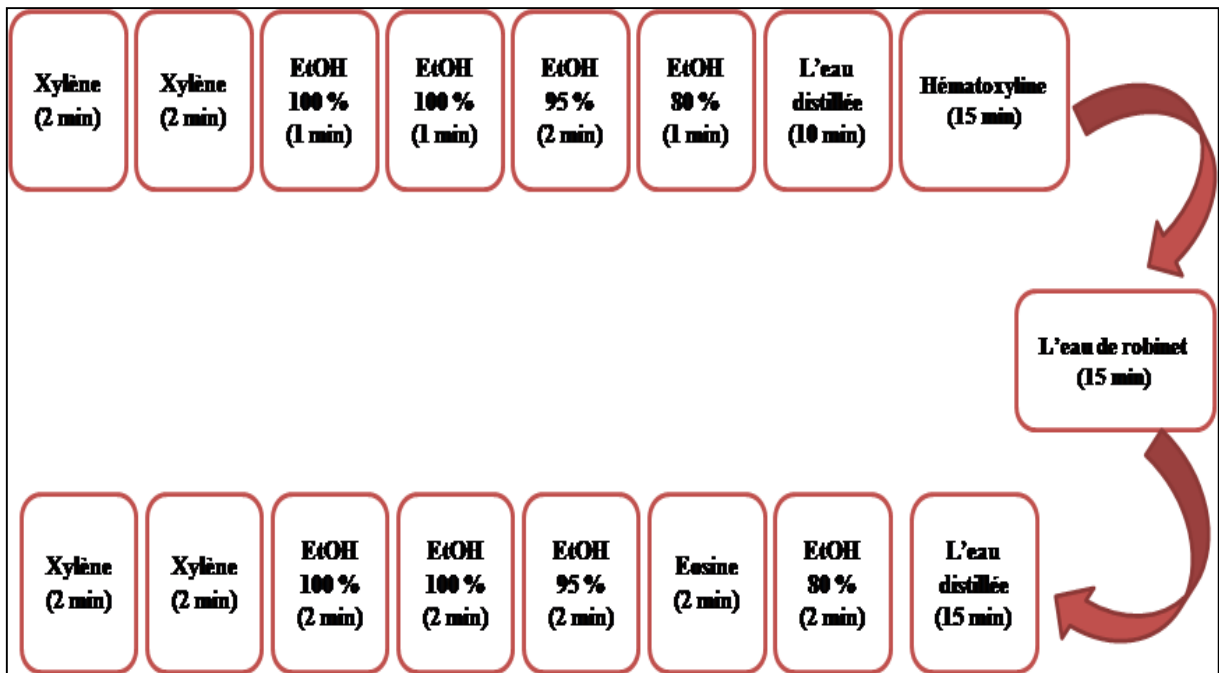


Fig.25 Schéma représente les étapes du déparaffinage, réhydratation, coloration et déshydratation.

d- Le montage et l'observation

Les coupes colorées sont montées entre lames et lamelles lesquelles sont préalablement nettoyées par du xylène puis quelques gouttes de l'Eukitt sont ajoutées afin d'éviter la formation des bulles d'air. Après séchage, l'observation est réalisée sous microscope photonique (ZEISS Axioscope, Göttingen, Allemagne) intégré à un camera digital VIVIDIA DOM300 (VIVIDIA Technologies, USA).

1-2-6- Détermination de la concentration thyroïdienne en chrome

Le dosage du contenu accumulé du chrome dans le tissu thyroïdien est réalisé par la spectrométrie d'absorption atomique SAA (PerkinElmer, France) au sein du laboratoire du centre de recherche scientifique et technique sur les régions arides- Biskra.

1-2-10- Analyse bio-statistique

Nos résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type (S.D). Les comparaisons statistiques ont été réalisées par une analyse de la variance (ANOVA) et suivi par les deux tests post-hoc, Tukey ; si la comparaison a été faite entre plusieurs groupes ou Dunnett ; si la comparaison a été faite par rapport au groupe témoin. Les différences sont considérées statistiquement significatives pour tous les paramètres étudiés si $p \leq 0.05$. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism, version 7. Ink (California, USA).



RESULTATS

2- Résultats

2-1- L'évaluation du poids corporel maternel et le poids absolu et relatif de la thyroïde

2-1-1- L'effet de l'administration des doses croissantes du $K_2Cr_2O_7$ sur le poids corporel maternel

Au cours de notre étude expérimentale, l'administration sous cutanée des doses croissantes du $K_2Cr_2O_7$ (10, 50 et 100 mg / kg. pc) a diminué d'une manière hautement significative ($p \leq 0,001$) le gain du poids corporel des rates gestantes aux 6^{ème} et 20^{ème} jours gestationnels en comparaison aux témoins (**Tableau 6**).

2-1-2- L'effet de l'administration des doses croissantes du $K_2Cr_2O_7$ sur le poids absolu de la glande thyroïdienne maternelle

L'administration des deux doses 10 et 100 mg /kg. pc du $K_2Cr_2O_7$ par voie sous cutanée aux rates preimplantées a provoqué une hypertrophie thyroïdienne caractérisée par une augmentation très significative ($p \leq 0,01$) du poids thyroïdien absolu comparativement au groupe témoin. Alors que la dose moyenne 50 mg /kg. pc $K_2Cr_2O_7$ n'a induit aucune différence significative du poids absolu de la thyroïde en comparaison avec le témoin (**Tableau 6**).

2-1-3- L'effet de l'administration des doses croissantes du $K_2Cr_2O_7$ sur le poids relatif de la glande thyroïdienne maternelle

Les deux doses 10 et 100 mg /kg. pc du $K_2Cr_2O_7$ ont induit une augmentation hautement significative ($p \leq 0,001$) du poids relatif de la glande thyroïdienne maternelle en comparaison avec le témoin, de même les rates gestantes traitées par 50 mg / kg. pc du $K_2Cr_2O_7$ ont marqué une augmentation très significative ($p \leq 0,01$) du poids thyroïdien relatif comparativement au groupe témoin (**Tableau 6**).

Tableau 6 : L'effet de l'administration des doses croissantes du $K_2Cr_2O_7$ sur le poids corporel maternel et le poids absolu et relatif de la thyroïde

Paramètres et groupes	Poids corporel maternel(g)			Poids thyroïdien absolu (g)	Poids thyroïdien relatif (g/ 100g. pc)
	3 ^{ème} jour	6 ^{ème} jour	20 ^{ème} jour		
Control	241,5±20,374	246,33±17,061	299,5±18,295	0,128±0,025	0,043±0,010
$K_2Cr_2O_7$ (10 mg/ kg)	183,83±9,283***	190,33±6,154***	222,5±5,468***	0,169±0,018**	0,076±0,009***
$K_2Cr_2O_7$ (50 mg/ kg)	197,5±5,718***	201±8,222***	233,667±15,526***	0,154±0,009	0,066±0,006**
$K_2Cr_2O_7$ (100 mg/ kg)	186,5±24,874***	196,167±21,274***	226,667±30,904***	0,171±0,022**	0,075±0,014***

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm S.D. $P \leq 0,05$ est considérée statistiquement significative, (*) significative en comparaison au control.

2-1-4- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se, le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur le poids corporel maternel

a- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se

Les résultats obtenus ont indiqué que le co-traitement des rates preimplantées avec le Se a amélioré la chute du poids corporel d'une manière significative ($p \leq 0,05$) en 6^{ème} jour et très significative ($p \leq 0,01$) en 20^{ème} jour de la gestation en comparaison avec le groupe traité par 10 mg / kg. pc du $K_2Cr_2O_7$.

b- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le $ZnCl_2$

Le poids corporel maternel a marqué une augmentation hautement significative ($p \leq 0,001$) en 20^{ème} jour de la gestation dans le groupe co-traité par le $ZnCl_2$ comparativement au groupe traité par le $K_2Cr_2O_7$ seul.

c- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association simultanée avec le Se et le $ZnCl_2$

Le co-traitement simultané avec le Se et le $ZnCl_2$ a provoqué une augmentation très significative ($p \leq 0,01$) du poids corporel maternel en 6^{ème} jour gestationnel comparativement avec le groupe traité seulement par 10 mg/ kg. pc du $K_2Cr_2O_7$.

2-1-5- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se, le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur le poids absolu thyroïdien des rates gestantes

Les trois co-traitements avec le Se ou le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément n'ont provoqué aucun changement significatif du poids absolu de la glande thyroïde des rates gestantes en comparaison avec le groupe traité par le 10 mg /kg. pc du $K_2Cr_2O_7$ (**Tableau 7**).

2-1-6- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se, le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur le poids relatif thyroïdien des rates gestantes

La co- administration du Se seul ou du $ZnCl_2$ seul n'a provoqué aucune amélioration significative du poids relatif thyroïdien des rates gestantes. Alors que le co-traitement concomitant avec les deux oligoéléments a induit une diminution hautement significative ($p \leq 0,001$) du poids relatif de la glande thyroïdienne en comparaison avec le groupe traité par le $K_2Cr_2O_7$ (**Tableau 7**).

Tableau 7 : Effets de la co-administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se, $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur le poids corporel maternel et le poids absolu et relatif thyroïdien.

Paramètres et groupes	Poids corporel maternel (g)			Poids thyroïdien absolu (g)	Poids thyroïdien relatif (g/ 100g. pc)
	3 ^{ème} jour	6 ^{ème} jour	20 ^{ème} jour		
Control	241,5±20,374	246,33±17,061	299,5±18,295	0,128±0,025	0,043±0,010
$K_2Cr_2O_7$ (10 mg/ kg)	183,83±9,283***	190,33±6,154***	222,5±5,468***	0,169±0,018**	0,076±0,009***
$K_2Cr_2O_7$ + Se (0.3mg/kg)	219±27,011 ⁺	222,83±25,27 ⁺	270±25,87 ⁺⁺	0,159±0,018	0,066±0,003
$K_2Cr_2O_7$ + $ZnCl_2$ (20 mg/ kg)	222,5±31,602 ⁺	217±27,525	270,167±13,977 ⁺⁺⁺	0,178±0,008	0,066±0,003
$K_2Cr_2O_7$ + Se+ $ZnCl_2$	233,167±25,717 ⁺⁺	241±22,935 ⁺⁺	271,33±32,172	0,149±0,012	0,055±0,005 ⁺⁺⁺

Les valeurs sont exprimés en moyenne \pm S.D. $P \leq 0,05$ est considérée statistiquement significative, (*) significative en comparaison au control. (+) significative en comparaison au $K_2Cr_2O_7$.

2-2- L'évaluation du profil hormonal de l'axe hypophyso-thyroïdien

2-2-1- L'effet de l'administration des doses croissantes du $K_2Cr_2O_7$ sur la concentration plasmatique en T3

a- L'effet de l'administration de la faible dose du $K_2Cr_2O_7$

Les résultats obtenus après la mesure de la concentration plasmatique en T3 ont montré que l'administration sous cutanée de la faible dose du $K_2Cr_2O_7$ (10 mg /kg. pc) a réduit significativement ($p \leq 0,001$) le taux plasmatique de la T3 en 6^{ème} jour ($3,683 \pm 0,686$ vs. $7,067 \pm 0,457$) et en 20^{ème} jour ($2,873 \pm 0,376$ vs. $5,56 \pm 0,792$) en comparaison avec le groupe témoin. Par ailleurs, la faible dose a induit la diminution la plus importante du taux plasmatique de la T3 en rapport avec les deux autres doses utilisées du $K_2Cr_2O_7$ (**Fig.28**).

b- L'effet de l'administration de la moyenne dose du $K_2Cr_2O_7$

Le traitement des rates gestantes par 50 mg /kg. pc du $K_2Cr_2O_7$ via la voie sous cutanée a provoqué une diminution hautement significative ($p \leq 0,001$) de la concentration plasmatique en T3 en 6^{ème} jour ($4,337 \pm 1,104$ vs. $7,067 \pm 0,457$) et en 20^{ème} jour de la gestation ($3,232 \pm 0,396$ vs. $5,56 \pm 0,792$) comparativement au groupe témoin (**Fig.28**).

c- L'effet de l'administration de la forte dose du $K_2Cr_2O_7$

Le groupe traité par la forte dose 100 mg / kg. pc du $K_2Cr_2O_7$ a marqué une chute hautement significative ($p \leq 0,001$) du taux plasmatique de la T3 ($3,872 \pm 0,896$ vs. $7,067 \pm 0,457$ et $3,788 \pm 0,941$ vs. $5,56 \pm 0,792$) respectivement en 6^{ème} et 20^{ème} jours gestationnels et comparativement au groupe témoin (**Fig.28**).

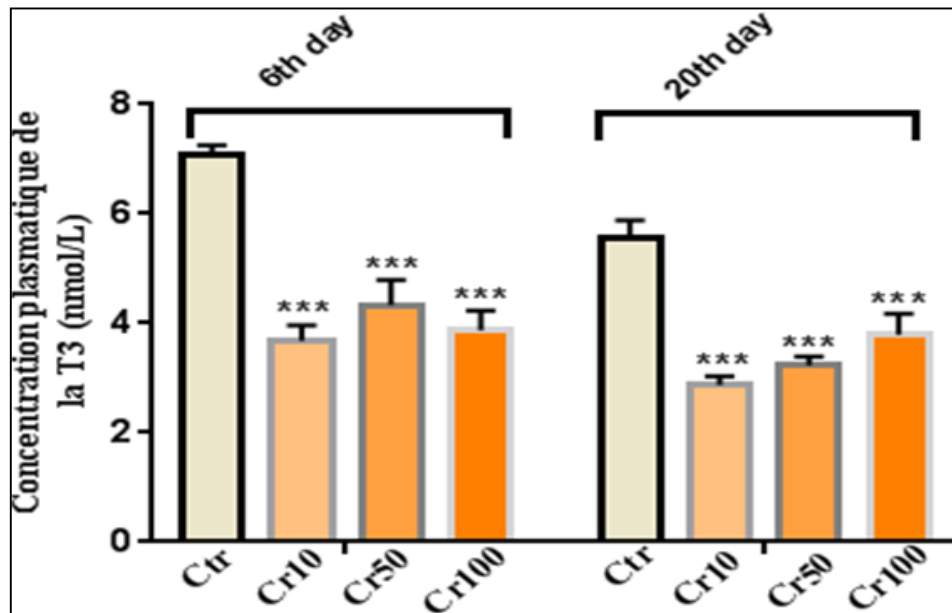


Fig. 28 Effets de l'administration des doses croissantes du $K_2Cr_2O_7$ sur la concentration plasmatique en T3. Les valeurs sont exprimés en moyenne \pm S.D. $P \leq 0,05$ est considérée statistiquement significative, (*) significative en comparaison au control.

2-2-2- L'effet de l'administration des doses croissantes du $K_2Cr_2O_7$ sur la concentration plasmatique en T4

La concentration plasmatique en T4 a diminué d'une façon non significative en 6^{ème} jour gestationnel après l'administration sous cutanée des trois doses croissantes du $K_2Cr_2O_7$. Néanmoins, au 20^{ème} jour de la gestation, le groupe traité par la faible dose 10 mg / kg. pc du $K_2Cr_2O_7$ a montré une diminution très significative ($p \leq 0,01$) du taux plasmatique de la T4 ($13,478 \pm 2,369$ vs. $19,115 \pm 1,763$) en comparaison avec le groupe témoin. De même, les rates gestantes traitées par 50 mg / kg. pc ont présenté une diminution très significative ($p \leq 0,01$) de la concentration plasmatique en T4 ($13,885 \pm 1,657$ vs. $19,115 \pm 1,763$) comparativement aux témoins (**Fig.29**).

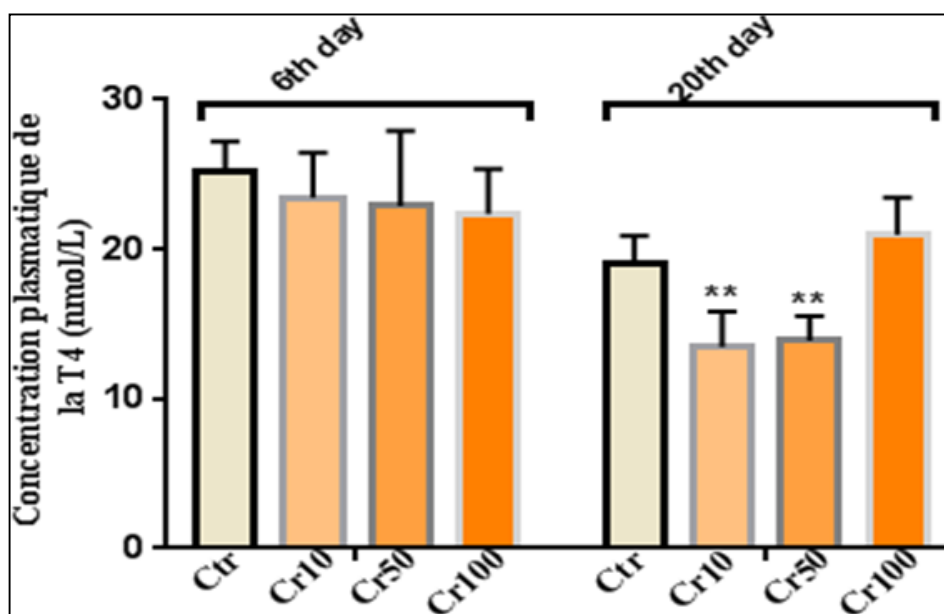


Fig. 29 Effets de l'administration des doses croissantes du $K_2Cr_2O_7$ sur la concentration plasmatique en T4. Les valeurs sont exprimés en moyenne \pm S.D. $P \leq 0,05$ est considérée statistiquement significative, (*) significative en comparaison au control.

2-2-3- L'effet de l'administration des doses croissantes du $K_2Cr_2O_7$ sur la concentration plasmatique en TSH

a- L'effet de l'administration de la faible dose du $K_2Cr_2O_7$

L'administration du faible dose 10 mg/kg. pc du $K_2Cr_2O_7$ a provoqué une augmentation hautement significative ($p \leq 0,001$) de la concentration plasmatique en TSH des rates gestantes en 6^{ème} jour ($0,115 \pm 0,02$ vs. $0,005 \pm 0,0005$) et en 20^{ème} jour ($0,103 \pm 0,014$ vs. $0,008 \pm 0,0008$) en comparaison avec le groupe témoin (**Fig.30**).

b- L'effet de l'administration de la moyenne dose du $K_2Cr_2O_7$

Cependant, le groupe traité par 50 mg /kg. pc du $K_2Cr_2O_7$ n'a montré aucune différence significative du taux plasmatique de la TSH au 6^{ème} et 20^{ème} jours gestationnels consécutivement et comparativement au groupe témoin (**Fig.30**).

c- L'effet de l'administration de la forte dose du $K_2Cr_2O_7$

Par ailleurs, l'administration sous cutanée de la forte dose 100 mg/ kg .pc du $K_2Cr_2O_7$ a provoqué une augmentation hautement significative ($p \leq 0,001$) du taux plasmatique de la TSH des rates en 20^{ème} jour de la gestation ($0,058 \pm 0,008$ vs. $0,008 \pm 0,0008$) en comparaison avec le groupe témoin (**Fig.30**).

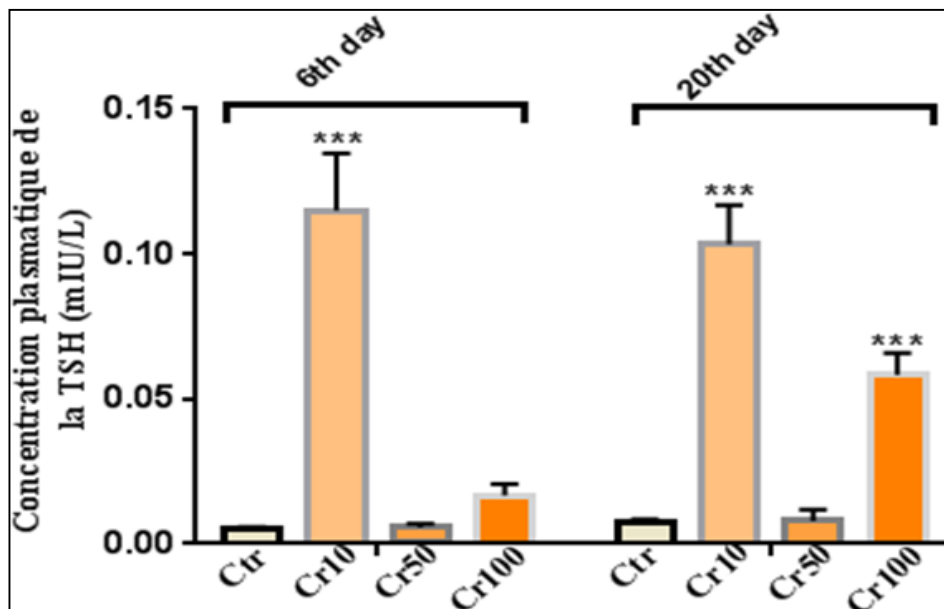


Fig. 30 Effets de l'administration des doses croissantes du $K_2Cr_2O_7$ sur la concentration plasmatique en TSH. Les valeurs sont exprimés en moyenne \pm S.D. $P \leq 0,05$ est considérée statistiquement significative, (*) significative en comparaison au control.

2-2-4- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se, le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur le taux plasmatique de la T3

a- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se

Le co-traitement avec le Se a augmenté significativement ($p \leq 0,05$) le taux plasmatique de la T3 seulement en 6^{ème} jour gestationnel ($4,657 \pm 0,316$ vs. $3,683 \pm 0,686$) en comparaison avec le groupe traité par 10 mg/ kg. pc du $K_2Cr_2O_7$ (**Fig.31**).

b- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le $ZnCl_2$

La co-administration du $ZnCl_2$ avec le $K_2Cr_2O_7$ a augmenté d'une manière hautement significative ($p \leq 0,001$) la concentration plasmatique en T3 des rates preimplantées en 6^{ème} jour ($6,638 \pm 0,327$ vs. $3,683 \pm 0,686$) et en 20^{ème} jour de la gestation ($4,227 \pm 0,465$ vs. $2,873 \pm 0,376$) comparativement au groupe traité par 10 mg/ kg. pc du $K_2Cr_2O_7$ (**Fig.31**).

c- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association simultanée avec le Se et le $ZnCl_2$

La co-administration concomitante du Se et du $ZnCl_2$ n'a amélioré pas significativement le taux plasmatique de la T3 des rates gestantes en comparaison avec le groupe traité par 10 mg/ kg du $K_2Cr_2O_7$ (**Fig.31**).

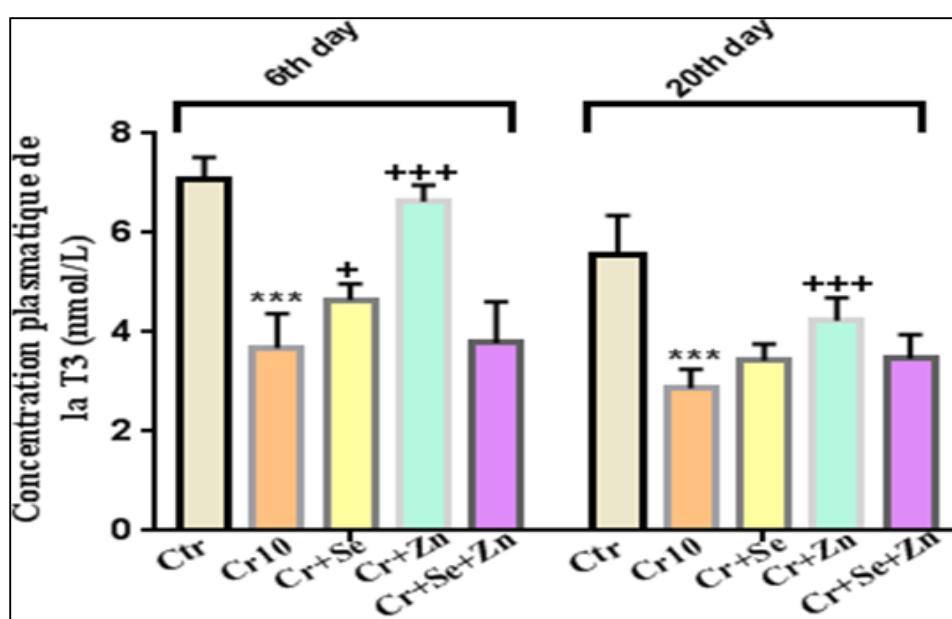


Fig.31 Effets de la co-administration du $K_2Cr_2O_7$ avec le Se, le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur la concentration plasmatique en T3. Les valeurs sont exprimés en moyenne \pm S.D. $P \leq 0.05$ est considérée statistiquement significative, (*) significative en comparaison au control. (+) significative en comparaison au $K_2Cr_2O_7$.

2-2-5- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se, le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur le taux plasmatique de la T4

a- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se

La co-administration avec le Se a augmenté très significativement ($p \leq 0,01$) la concentration plasmatique en T4 des rates gestantes en 20^{ème} jour ($17,062 \pm 0,439$ vs. $13,478 \pm 2,369$) comparativement au groupe traité par 10 mg/ kg. pc du $K_2Cr_2O_7$ (**Fig.32**).

b- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le $ZnCl_2$

Le co-traitement avec le $ZnCl_2$ a corrigé l'hypothyroïdie induite par le $K_2Cr_2O_7$ chez les rates gestantes. En effet, le taux plasmatique de la T4 a augmenté très significativement ($p \leq 0,01$) en 6^{ème} et 20^{ème} jours gestationnels ($26,907 \pm 1,334$ vs. $23,468 \pm 2,966$) et ($17,375 \pm 0,74$ vs. $13,478 \pm 2,369$) respectivement et comparativement au groupe traité par le $K_2Cr_2O_7$ (10 mg/ kg. pc) (**Fig.32**).

c- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association simultanée avec le Se et le $ZnCl_2$

Le co-traitement simultané avec le Se et $ZnCl_2$ à la fois n'a induit aucun changement significatif concernant le taux plasmatique de la T4 des rates gestantes en comparaison avec le groupe traité par le $K_2Cr_2O_7$ (10 mg/ kg. pc) (**Fig.32**).

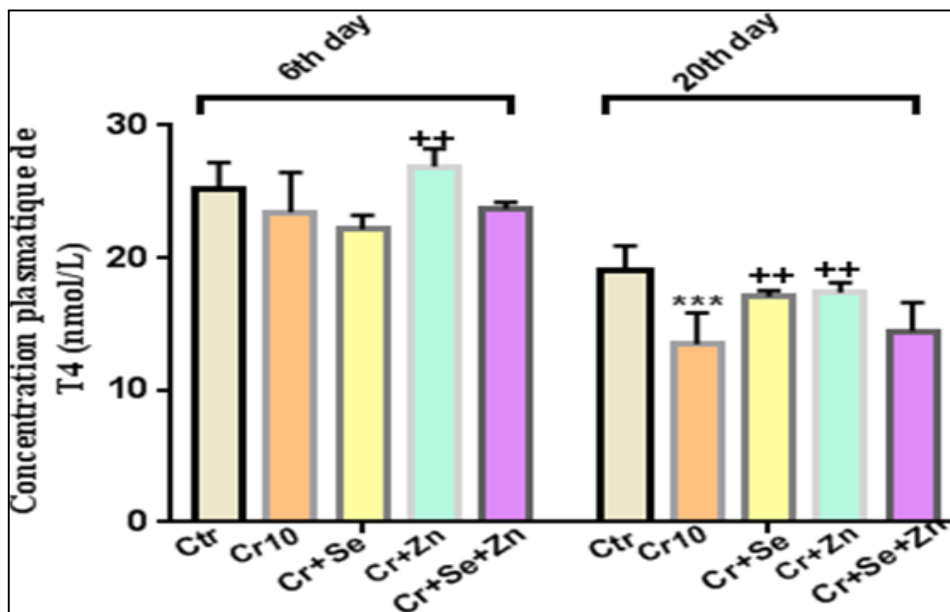


Fig.32 Effets de la co-administration du $K_2Cr_2O_7$ avec le Se, le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur la concentration plasmatique en T4. Les valeurs sont exprimés en moyenne \pm S.D. $P \leq 0,05$ est considérée statistiquement significative, (*) significative en comparaison au control. (+) significative en comparaison au $K_2Cr_2O_7$.

2-2-6- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se, le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur le taux plasmatique de la TSH

a- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se

Les résultats illustrés dans la figure 6 ont indiqué que la co-administration du $K_2Cr_2O_7$ avec le Se a induit une diminution hautement significative ($p \leq 0,001$) de la concentration plasmatique en TSH aux 6^{ème} et 20^{ème} jours gestationnels ($0,088 \pm 0,008$ vs. $0,115 \pm 0,02$) et ($0,078 \pm 0,008$ vs. $0,103 \pm 0,014$) respectivement et comparativement avec le groupe traité par le $K_2Cr_2O_7$ (10 mg/ kg. pc) (**Fig.33**).

b- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le $ZnCl_2$

Le groupe co-traité avec le $ZnCl_2$ a montré une diminution hautement significative ($p \leq 0,001$) du taux plasmatique de la TSH des rates gestantes au 6^{ème} jour ($0,075 \pm 0,008$ vs. $0,115 \pm 0,02$) et au 20^{ème} jour ($0,077 \pm 0,012$ vs. $0,103 \pm 0,014$) en comparaison avec le groupe traité par le $K_2Cr_2O_7$ (**Fig.33**).

c- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association simultanée avec le Se et le $ZnCl_2$

De façon similaire, le co-traitement concomitant avec le Se et le $ZnCl_2$ a réduit significativement ($p \leq 0,05$) le taux plasmatique de la TSH des rates gestantes au 6^{ème} jour ($0,097 \pm 0,005$ vs. $0,115 \pm 0,02$) et en 20^{ème} jour ($0,085 \pm 0,005$ vs. $0,103 \pm 0,014$) comparativement avec le groupe traité par le $K_2Cr_2O_7$ (Fig.33).

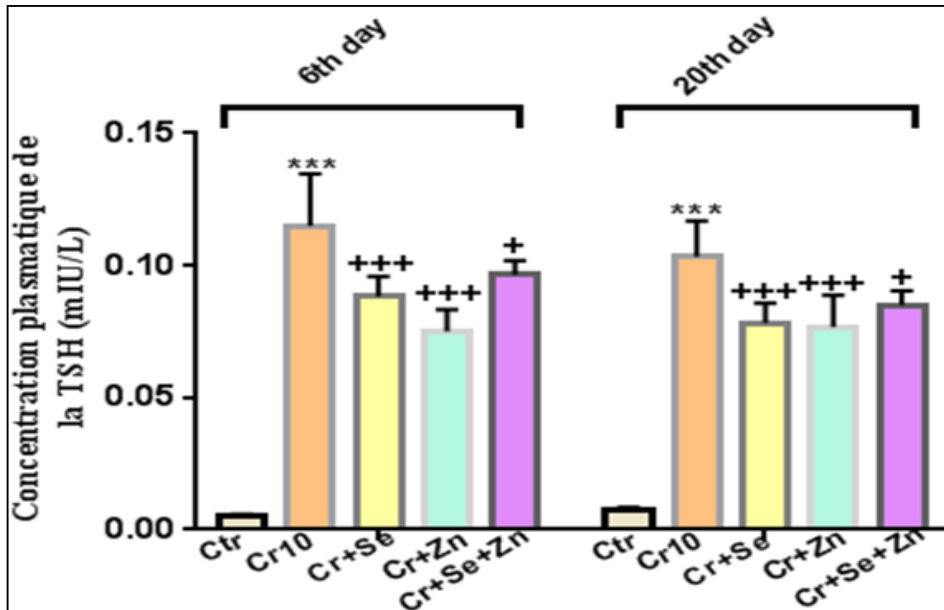


Fig.33 Effets de la co-administration du $K_2Cr_2O_7$ avec le Se, le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur la concentration plasmatique en TSH. Les valeurs sont exprimés en moyenne \pm S.D. $P \leq 0,05$ est considérée statistiquement significative, (*) significative en comparaison au control. (+) significative en comparaison au $K_2Cr_2O_7$.

2-3- L'étude histologique

2-3-1- L'effet de l'administration des doses croissantes du $K_2Cr_2O_7$ sur l'histoarchitecture thyroïdienne

- L'examen microscopique des coupes histologiques de la glande thyroïdienne du groupe témoin a montré un parenchyme thyroïdien de structure régulière composé principalement de follicules de tailles variables avec la prédominance de macro-follicules. Les follicules sont remplis d'un colloïde éosinophile composé principalement de la thyroglobuline et entouré d'une monocouche d'épithélium aplati composé des thyrocytes. L'espace inter-folliculaire apparaît mince et constitué du tissu conjonctif avec des capillaires et des cellules para-folliculaires groupées en amas. Le volume des cellules épithéliales apparaît normal (**Fig.34**).

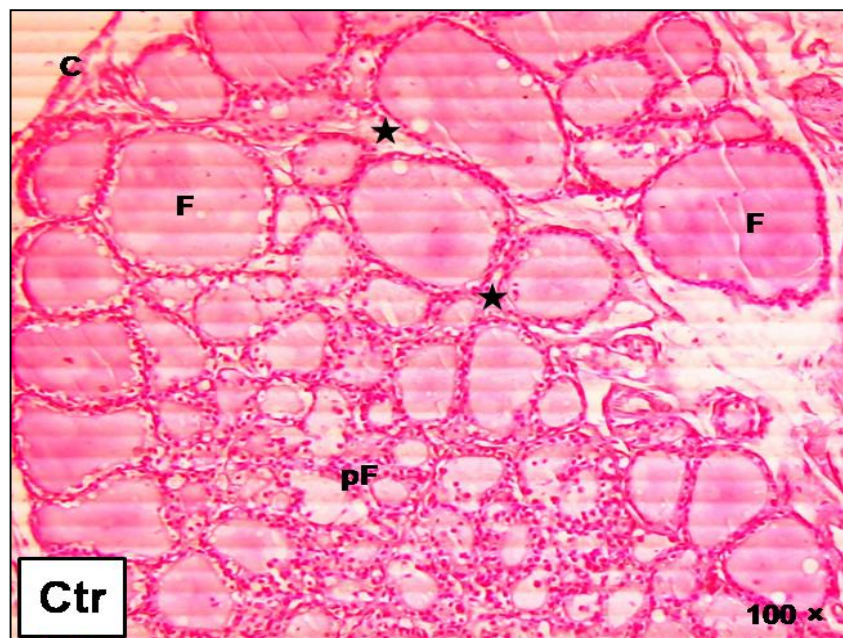
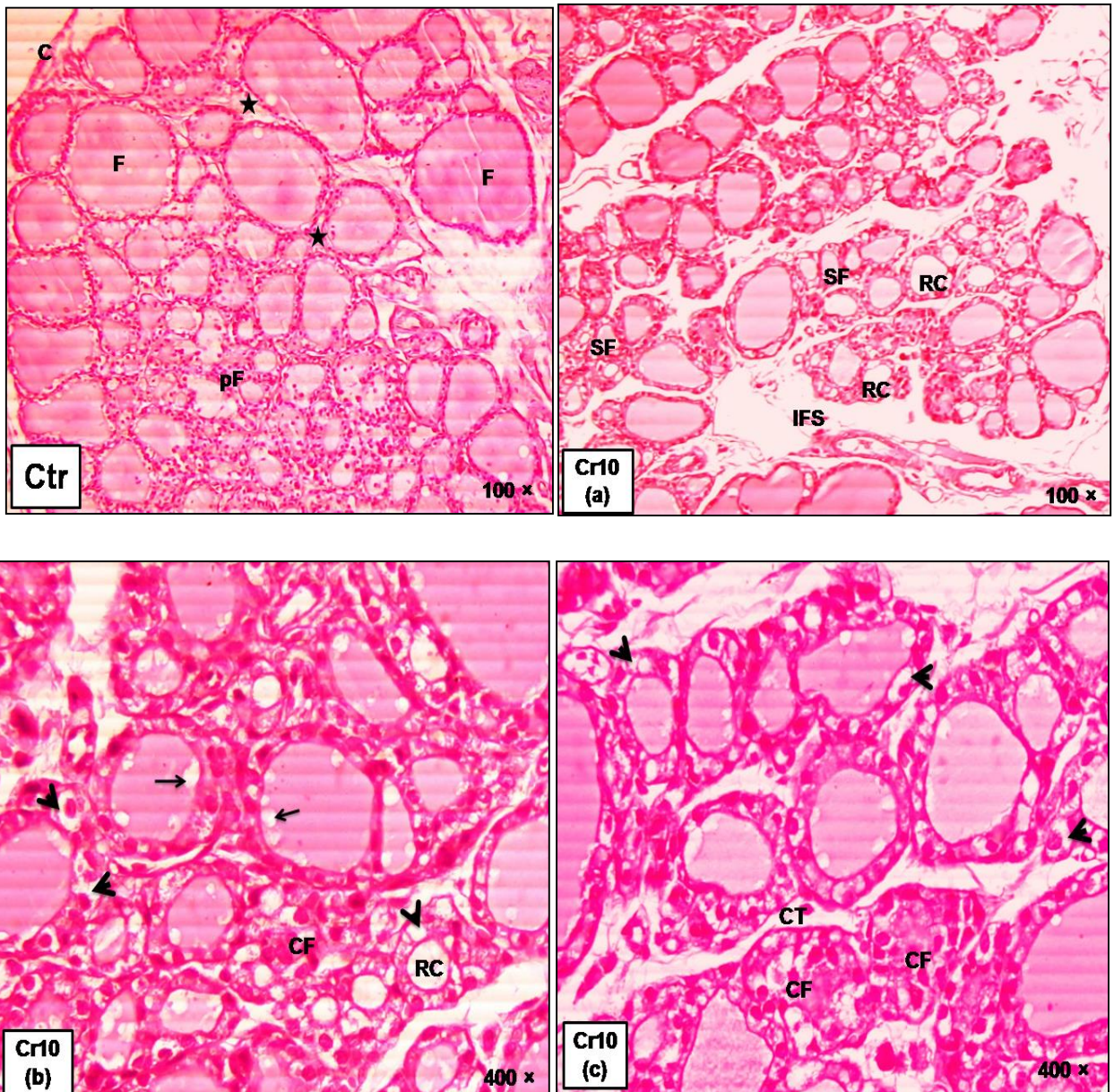


Fig. 34 Photomicrographie d'une coupe histologique (H & E) de la glande thyroïdienne du groupe témoin (Ctr), le parenchyme thyroïdien semblait bien organisé; recouvert d'une capsule (C), et composé des follicules avec la prépondérance des macro-follicules (F), cellules para-folliculaires (pF) et tissu conjonctif (étoile).

a- L'effet de l'administration de la faible dose du $K_2Cr_2O_7$

Les photomicrographies du tissu thyroïdien des rates gestantes traitées par la faible dose du $K_2Cr_2O_7$ (10 mg/ kg. pc) ont montré que ce perturbateur endocrinien a induit des altérations dans l'histoarchitecture thyroïdienne en comparaison avec le groupe témoin.

Ainsi, ces altérations histologiques sont objectivées par un parenchyme thyroïdien mal organisé, caractérisé par la prédominance des micro-follicules, l'interruption des parois folliculaires qui a conduit à l'effondrement de nombreux follicules. De plus, leur matière colloïdale était remplie de cellules épithéliales exfoliées. D'autre part, les cellules épithéliales semblaient hypertrophiques et vacuolées alors que, le colloïde était dilué et réduit remarquablement avec la présence des vacuoles de résorption à la périphérie de la paroi folliculaire. Le tissu conjonctif s'est désintégré et la zone folliculaire est réduite, par conséquent l'espace inter-folliculaire est massivement agrandi (**Fig.35**).



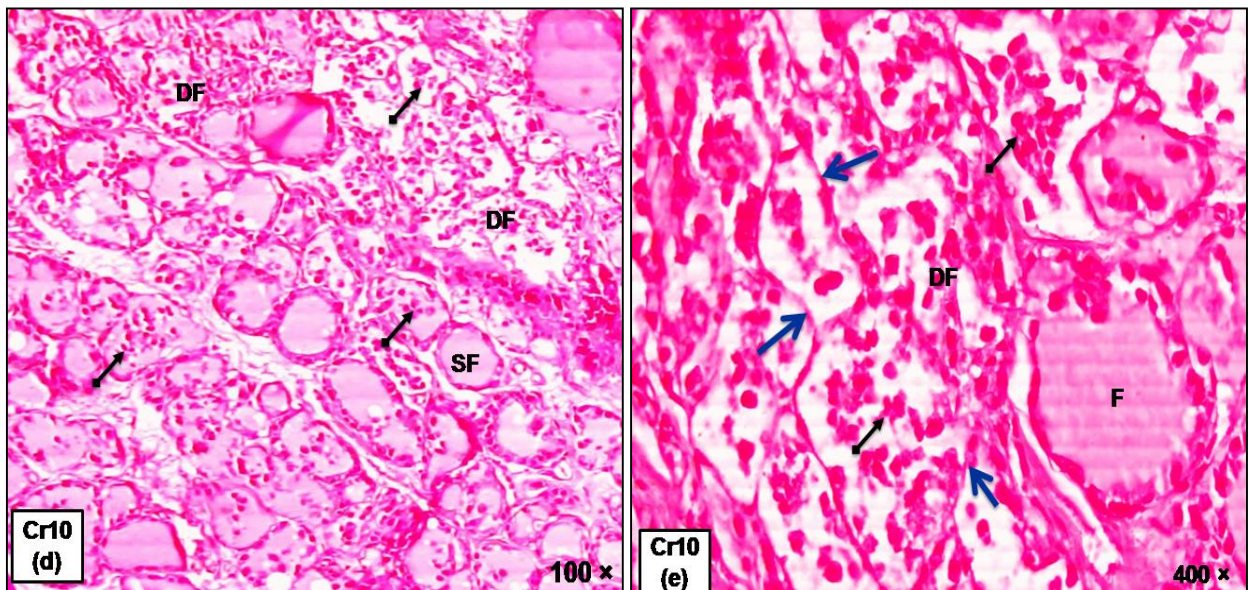


Fig. 35 Photomicrographies des coupes histologiques (H & E) de la glande thyroïdienne des rates gestantes traitées par la faible dose du $K_2Cr_2O_7$: (SF) des micro-follicules, (RC) colloïde réduit, (IFS) espace inter-folliculaire élargi, (petite flèche fine) vacuoles dans le colloïde, (tête de flèche) thyrocytes hypertrophiques, (CF) follicules effondrés, (CT) tissu conjonctif dissolu, (flèche à double tête) thyrocytes pavimenteuses, (DF) follicules dégénérés, (flèche épaisse bleue) interruption de l'épithélium thyrocytaire.

b- L'effet de l'administration de la dose moyenne du $K_2Cr_2O_7$

Les coupes histologiques de la glande thyroïdienne des rates gestantes traitées par la moyenne dose du $K_2Cr_2O_7$ (50 mg/ kg. pc) ont présenté des dommages structurels du tissu thyroïdien comparativement au témoin. Ainsi, l'examen microscopique a révélé un parenchyme thyroïdien mal organisé avec la prépondérance des micro-follicules ayant des cellules épithéliales enflées. En outre, la matière colloïdale de certains follicules est diluée, ainsi que la plupart des follicules ont présenté des vacuoles dans leur matière colloïdale. En plus, les cellules thyrocytaires sont hypertrophiques, pavimenteuses et remplies par les vacuoles. Suite à l'interruption des membranes folliculaires, l'effondrement et la dégénérescence de nombreux follicules sont également évidents (**Fig.36**).

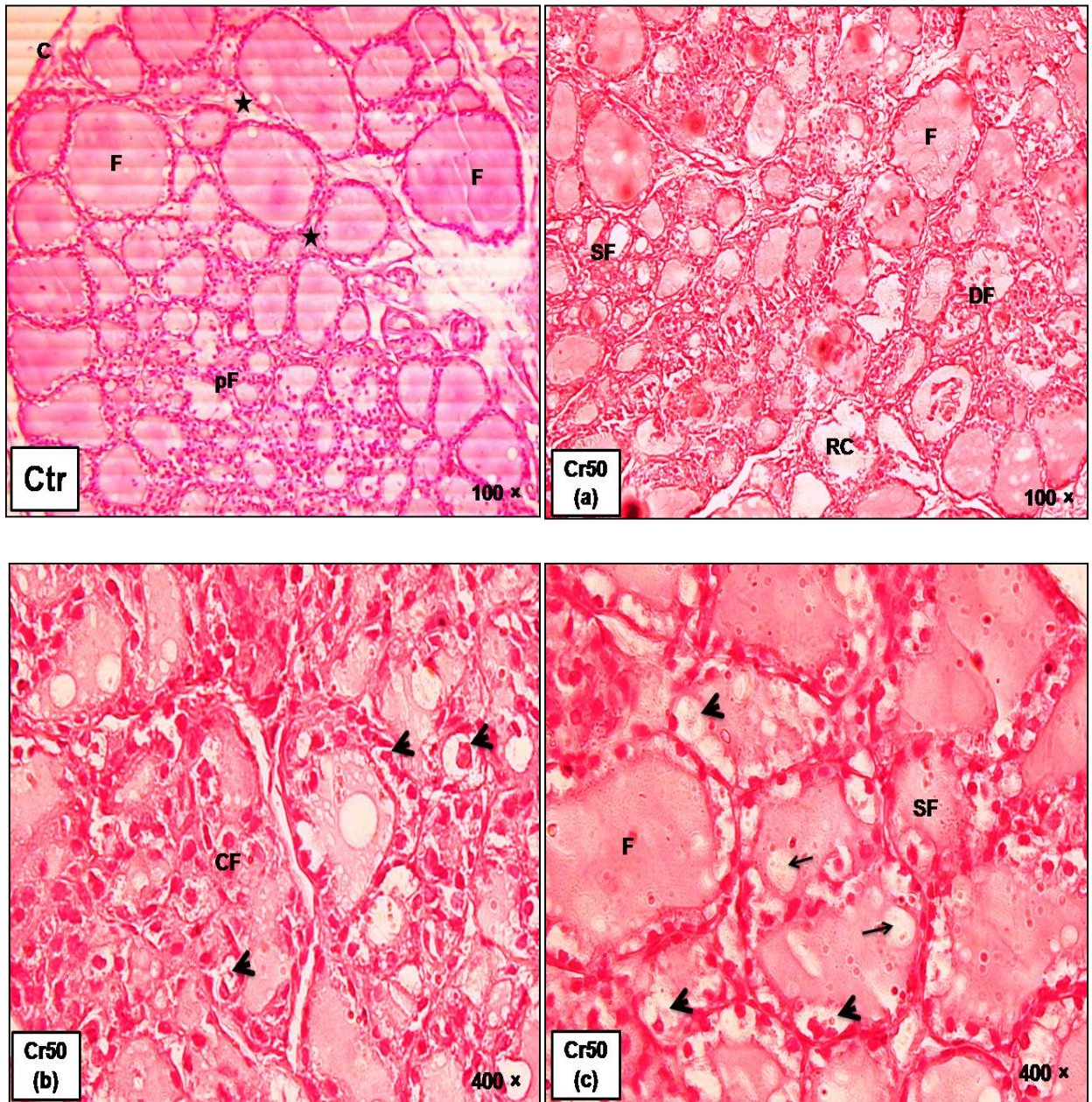


Fig.36 Photomicrographies des coupes histologiques (H & E) de la glande thyroïdienne des rates gestantes traitées par la moyenne dose du $K_2Cr_2O_7$: (SF) des micro-follicules, (RC) colloïde réduit, (petite flèche fine) vacuoles dans le colloïde, (tête de flèche) thyrocytes hypertrophiques pavimenteuses, (CF) follicules effondrés, (DF) follicules dégénérés.

c- L'effet de l'administration de la forte dose du $K_2Cr_2O_7$

L'examen microscopique des coupes histologiques de la thyroïde des rates pré-implantées traitées par la forte dose du $K_2Cr_2O_7$ a révélé des altérations au niveau de la structure des follicules, des thyrocytes et le tissu conjonctif en comparaison avec le groupe témoin. Ainsi, la

présence des micro-follicules est dominante par rapport aux follicules plus larges. En plus, les thyrocytes sont détachées de l'épithélium folliculaire ce qui a conduit à l'effondrement des follicules. Ces derniers sont désorganisés avec une membrane rompue et un colloïde rempli par les thyrocytes pavimenteuses (**Fig.37**).

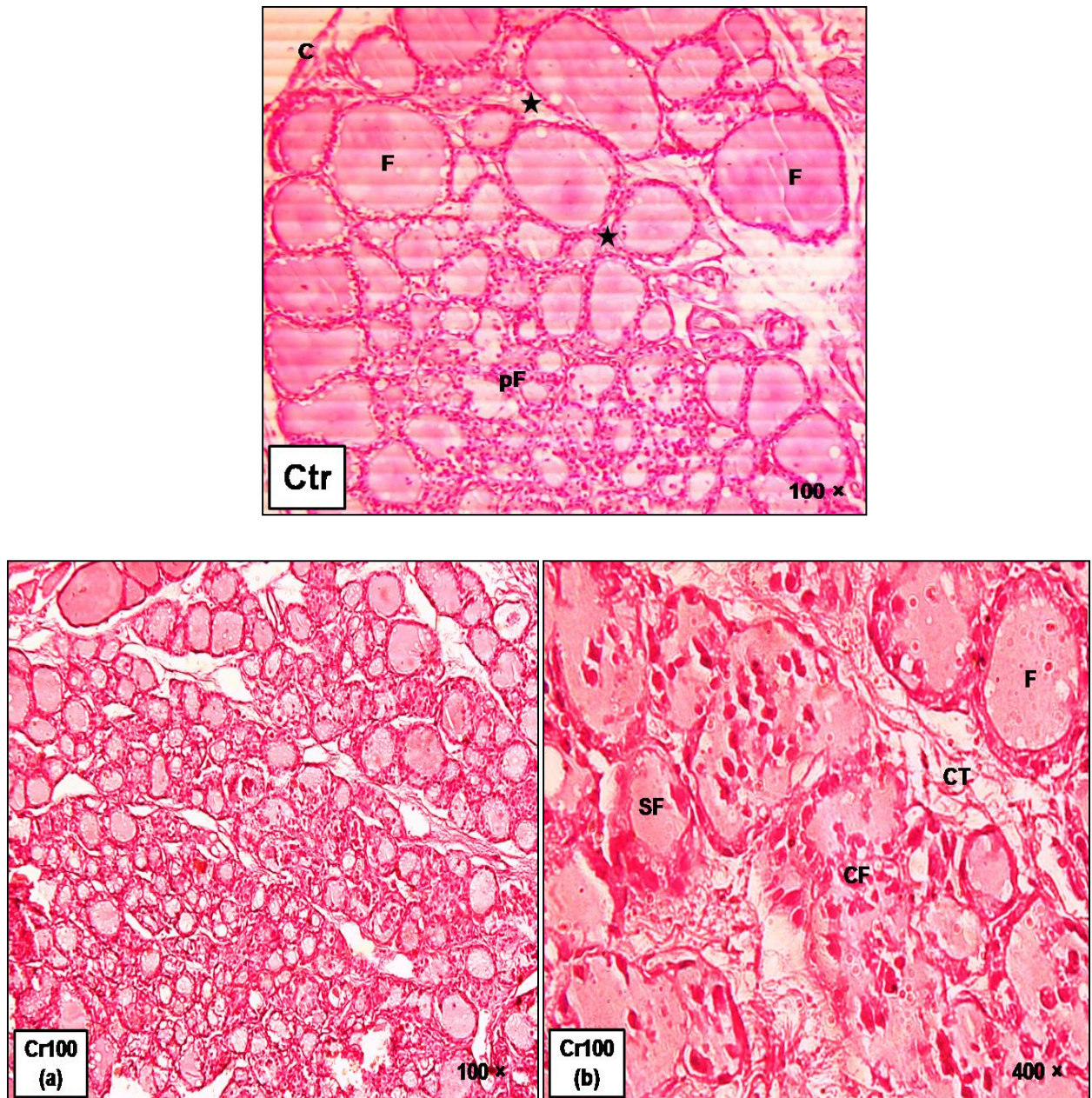


Fig.37 Photomicrographies des coupes histologiques (H & E) de la glande thyroïdienne du des rates gestantes intoxiquées par la forte dose du $K_2Cr_2O_7$: (SF) des micro-follicules, (CF) follicules effondrés, (CT) tissu conjonctif dissolu.

2-3-2- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se, le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur l'histoarchitecture thyroïdienne

a- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se

L'observation microscopique des coupes histologiques de la thyroïde du groupe co-traité avec le $K_2Cr_2O_7$ et le Se ont montré que le Se a restauré partiellement la structure histologique thyroïdienne comparativement au groupe traité seulement avec la faible dose du $K_2Cr_2O_7$. Ainsi, les follicules semblent plutôt grands et remplis du colloïde riche, et ils ont été entourés d'un épithélium plat. L'espace inter-folliculaire n'était pas apparent. Cependant, le colloïde de certains follicules a été rempli de cellules pavimenteuses. De plus, la présence des micro-follicules ayant des cellules thyrocytaires légèrement vacuolées est évidente (**Fig.38**).

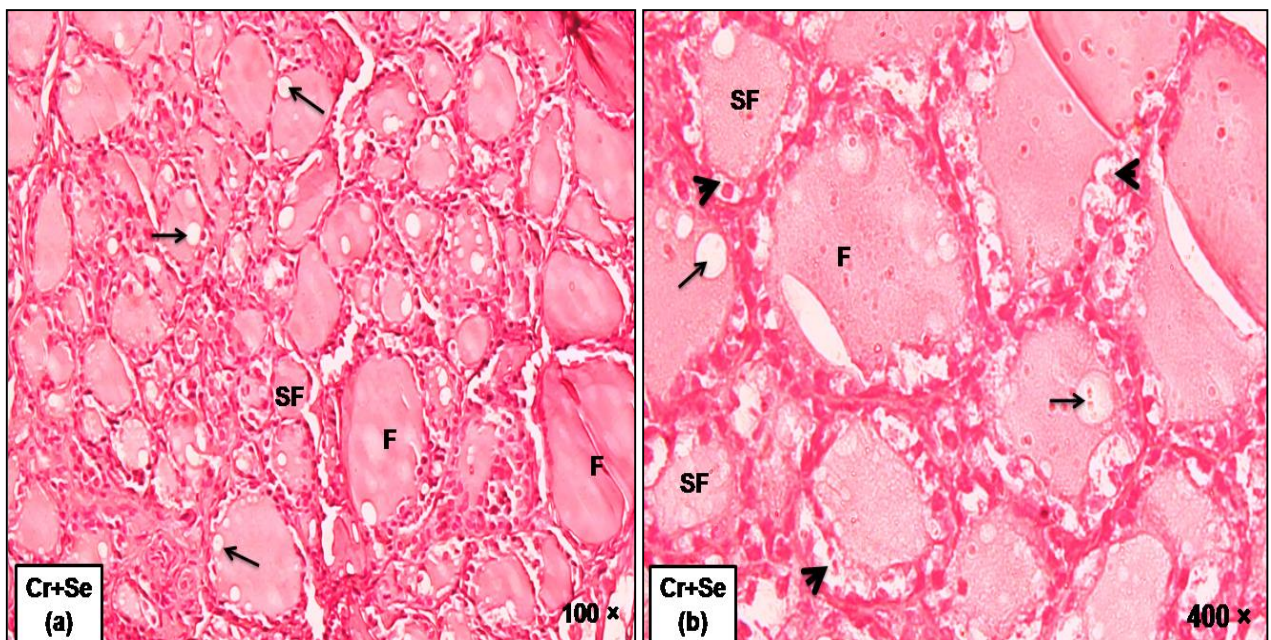


Fig. 38 Photomicrographies des coupes histologiques (H & E) de la glande thyroïdienne des rates gestantes traitées avec le $K_2Cr_2O_7$ en association avec le Se : (F) macro-follicules, (SF) micro-follicules (SF), (petite flèche fine) vacuoles dans le colloïde, (tête de flèche) des cellules épithéliales pavimenteuses hypertrophiques.

b- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le $ZnCl_2$

Dans le groupe traité par le $K_2Cr_2O_7$ et le $ZnCl_2$, l'analyse microscopique a montré qu'à part de la présence de certaines vacuoles aux bords de la matière colloïdale, l'administration de

ZnCl₂ a presque restauré l'histoarchitecture thyroïdienne des rates *Albinos Wistar* gravides en comparaison avec le groupe traité par la faible dose du K₂Cr₂O₇ (10 mg/ kg. pc) (**Fig.39**).

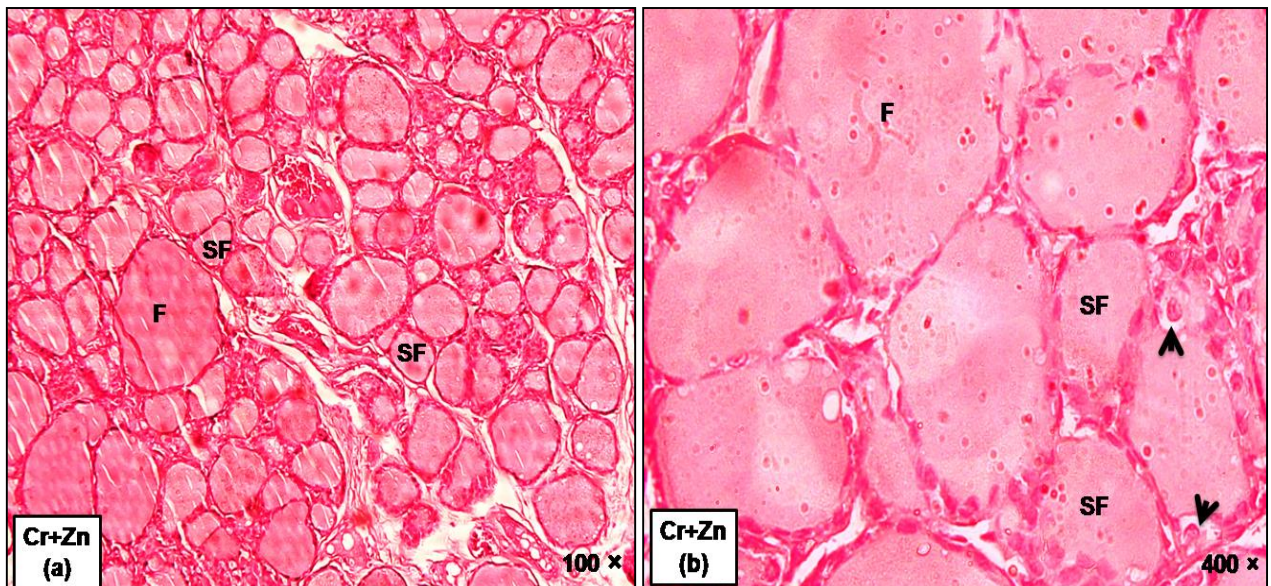


Fig. 39 Photomicrographies des coupes histologiques (H & E) de la glande thyroïdienne des rates gestantes traitées avec le K₂Cr₂O₇ en association avec le ZnCl₂ : (F) macro-follicules, (SF) micro-follicules, (tête de flèche) la présence de quelques vacuoles dans les thyrocytes.

c- L'effet de l'administration du K₂Cr₂O₇ seul ou en association simultanée avec le Se et le ZnCl₂

D'après les photomicrographies du groupe co-traité simultanément au K₂Cr₂O₇, Se et ZnCl₂, la présence de micro-follicules avec des thyrocytes gonflées, ainsi que la vacuolisation du colloïde sont notés. De plus, des follicules effondrés sont fusionnés avec ceux qui l'entourent en raison de l'interruption de leurs parois folliculaires. Les résultats de l'étude histologique ont montré que le co-traitement avec le Se ou le ZnCl₂ a exhibé des effets protecteurs remarquables dans la thyroïde de rates gestantes en comparaison avec le groupe traité avec la faible dose du K₂Cr₂O₇. Alors que, l'administration concomitante des deux éléments était moins efficace pour restaurer l'histoarchitecture thyroïdienne (**Fig.40**).

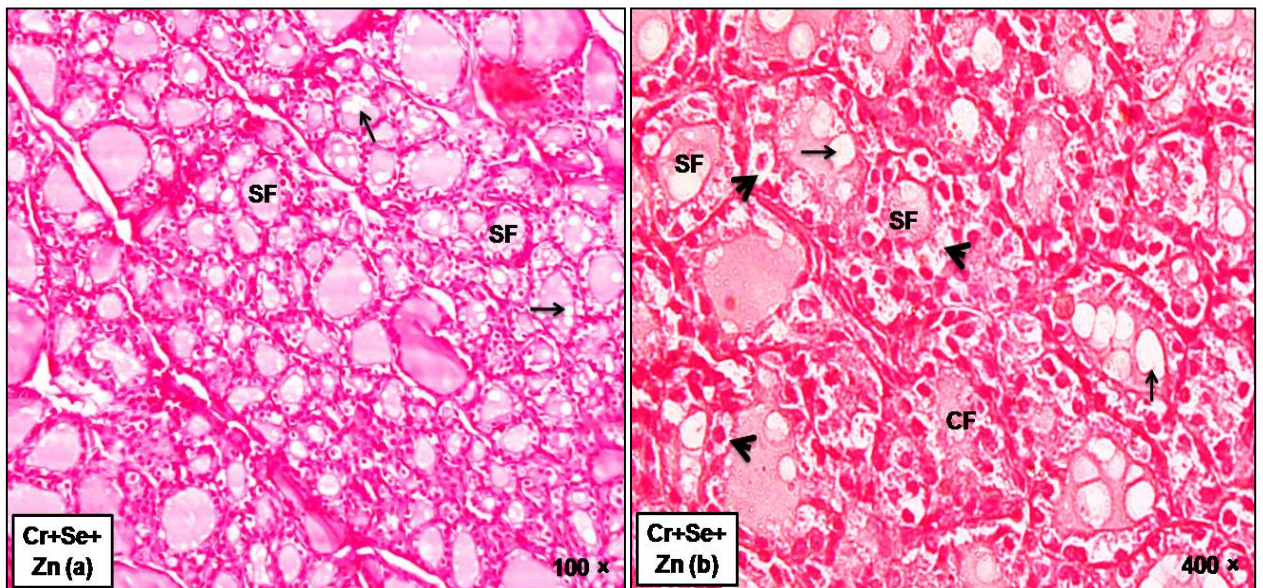


Fig. 40 Photomicrographies des coupes histologiques (H & E) de la glande thyroïdienne des rates gestantes traitées avec le $K_2Cr_2O_7$ en association simultanée avec le Se et le $ZnCl_2$: (SF) des micro-follicules, (petite flèche fine) un colloïde hyper-vacuolé, (tête de flèche) des thyrocytes hypertrophiques, (CF) des follicules effondrés.

2-4- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se et le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur la bioaccumulation du Cr dans la thyroïde

a- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul

La bioaccumulation du chrome a été estimée dans le tissu thyroïdien par spectrométrie d'absorption atomique. D'après les données illustrées dans **la Fig.41**, l'administration sous cutanée de 10 mg/ kg. pc du $K_2Cr_2O_7$ a provoqué une augmentation hautement significative ($p \leq 0.001$) de la concentration en Cr dans le tissu thyroïdien ($0,475 \pm 0,162$ vs. $0,036 \pm 0,043$) en comparaison avec le groupe témoin.

b- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se

Le co-traitement avec le Se a provoqué une réduction hautement significative ($p \leq 0.001$) du contenu thyroïdien en Cr chez les rates gestantes ($0,072 \pm 0,071$ vs. $0,475 \pm 0,162$) comparativement avec le groupe traité par 10 mg/ kg. pc du $K_2Cr_2O_7$ (**Fig.41**).

c- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le $ZnCl_2$

Le groupe co-traité avec le $ZnCl_2$ a montré une diminution hautement significative ($p \leq 0.001$) de la concentration en Cr dans la glande thyroïdienne des rates gestantes ($0,069 \pm 0,007$ vs. $0,475 \pm 0,162$) en comparaison avec le groupe témoin (**Fig.41**).

d- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association simultanée avec le Se et le $ZnCl_2$

Le co-traitement simultané du Se et du $ZnCl_2$ a induit une diminution très significative ($p \leq 0,01$) de la concentration en Cr dans le tissu thyroïdien des rates gestantes ($0,0228 \pm 0,113$ vs. $0,475 \pm 0,162$) en comparaison avec le groupe témoin (**Fig.41**).

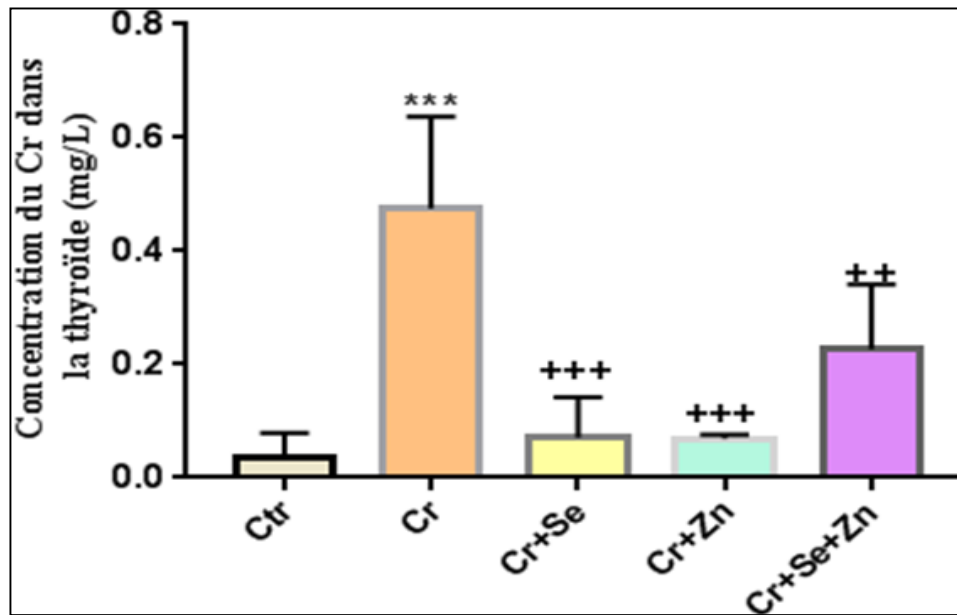


Fig.41 Effets de la co-administration du Se, ZnCl₂ ou les deux simultanément sur la bioaccumulation du Cr dans la thyroïde. Les valeurs sont exprimés en moyenne \pm S.D. $P \leq 0,05$ est considérée statistiquement significative, (*) significative en comparaison au control. (+) significative en comparaison au K₂Cr₂O₇.

2-5- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se et le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur l'activité de la caspase- 3 dans la thyroïde

a- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul

Le traitement des rates gestantes par le $K_2Cr_2O_7$ (10 mg/ kg. pc) a provoqué une élévation hautement significative ($p \leq 0,001$) de l'activité de la caspase- 3 dans la thyroïde ($0,714 \pm 0,143$ vs. $0,319 \pm 0,043$) en comparaison avec le groupe contrôle (**Fig.42**).

b- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se

Le co-traitement avec le Se a abaissé l'activité de la caspase- 3 significativement ($p \leq 0,05$) dans le tissu thyroïdien des rates gestantes ($0,482 \pm 0,086$ vs. $0,714 \pm 0,143$) en comparaison avec le groupe traité par le $K_2Cr_2O_7$ (**Fig.42**).

c- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le $ZnCl_2$

Le groupe co-traité avec le $ZnCl_2$ a montré une diminution très significative de l'activité de la caspase- 3 ($p \leq 0,01$) dans la glande thyroïdienne des rates gestantes ($0,454 \pm 0,04$ vs. $0,714 \pm 0,143$) comparativement avec le groupe traité avec le $K_2Cr_2O_7$ (**Fig.42**).

d- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association simultanée avec le Se et le $ZnCl_2$

La co-administration concomitante du Se et du $ZnCl_2$ a diminué très significativement ($p \leq 0,01$) l'activité de la caspase- 3 dans la thyroïde des rates gestantes ($0,473 \pm 0,177$ vs. $0,714 \pm 0,143$) comparativement avec le groupe traité avec le $K_2Cr_2O_7$ (**Fig.42**).

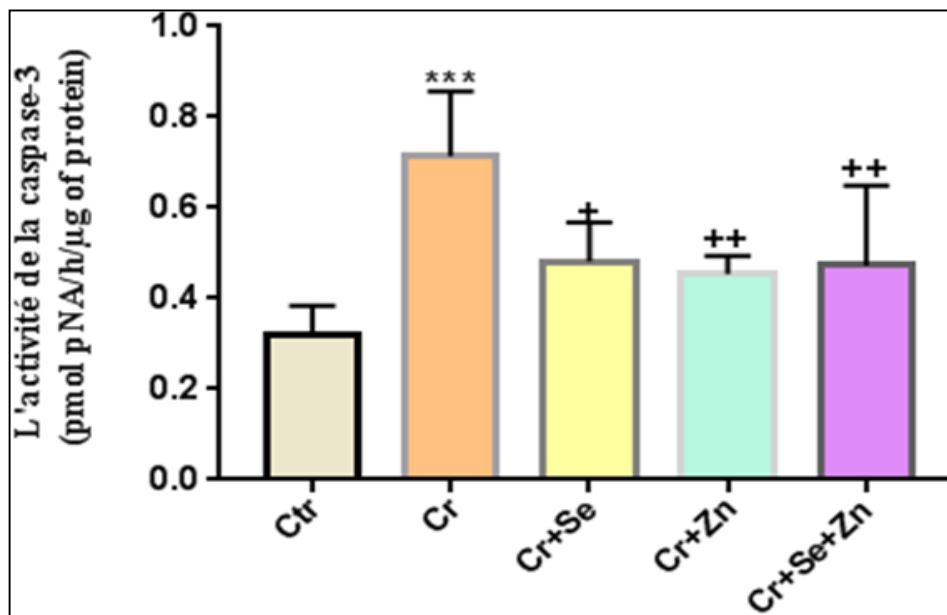


Fig. 42 Effets de la co-administration du $K_2Cr_2O_7$ avec Se, $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur l'activité de la caspase- 3. Les valeurs sont exprimés en moyenne \pm S.D. $P \leq 0,05$ est considérée statistiquement significative, (*) significative en comparaison au control. (+) significative en comparaison au $K_2Cr_2O_7$.

2-6- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se et le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur les bio-marqueurs du stress oxydatif dans la thyroïde

2-6-1- Le taux des protéines carbonylées

a- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul

La génération des protéines carbonylées représente un test indicatif de l'oxydation des protéines. Nos résultats indiquent que l'administration sous cutanée du $K_2Cr_2O_7$ (10 mg/ kg. pc) a provoqué une augmentation hautement significative ($p \leq 0,001$) du taux de protéines carbonylées dans la thyroïde des rates gestantes en comparaison avec le groupe témoin (**Tableau 8**).

b- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se

Considérant le co-traitement avec le Se, les résultats obtenus ont montré une diminution très significative ($p \leq 0,01$) du taux des protéines carbonylées dans les homogénats thyroïdiens des rates gravides en comparaison avec le groupe traité par le $K_2Cr_2O_7$ seul (**Tableau 8**).

c- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le $ZnCl_2$

Le co-traitement avec le $ZnCl_2$ a contrebalancé le pouvoir oxydant du $K_2Cr_2O_7$ en diminuant la formation de groupements carbonylées d'une manière hautement significative ($p \leq 0,001$) comparativement avec le groupe traité seulement par 10 mg/ kg. pc du $K_2Cr_2O_7$ (**Tableau 8**).

d- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association simultanée avec le Se et le $ZnCl_2$

Le groupe co-traité simultanément avec le Se et le $ZnCl_2$ a montré une diminution significative ($p \leq 0,05$) du taux des protéines carbonylées en comparaison avec le groupe traité par le $K_2Cr_2O_7$ seul (**Tableau 8**).

2-6-2-Le taux de malondialdéhyde

a- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul

Concernant la peroxydation lipidique, l'estimation du taux du malondialdéhyde est un test indicatif de l'oxydation des lipides et les acides gras polyinsaturés. Les données de la présente étude ont indiqué que le $K_2Cr_2O_7$ a induit la formation du MDA très significativement ($p \leq 0,01$) dans l'extrait de la glande thyroïdienne des rates gestantes comparativement aux témoins (**Tableau 8**).

b- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se

Le co-traitement avec le Se a atténué l'oxydation des lipides en diminuant le taux du MDA d'une manière hautement significative ($p \leq 0,001$) dans la thyroïde des rates gestantes en comparaison avec le groupe traité seulement avec le $K_2Cr_2O_7$ (**Tableau 8**).

c- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le $ZnCl_2$

Les résultats ont montré que le co-traitement avec le $ZnCl_2$ a induit une diminution hautement significative ($p \leq 0,001$) de la formation du MDA dans la thyroïde des rates gestantes comparativement aux rates traitées par le $K_2Cr_2O_7$ (**Tableau 8**).

d- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association simultanée avec le Se et le $ZnCl_2$

Le co-traitement concomitant des deux oligo-éléments ; le Se et le $ZnCl_2$ a provoqué une diminution hautement significative ($p \leq 0,001$) du taux du MDA dans la glande thyroïdienne des rates gestantes comparativement au groupe traité par le $K_2Cr_2O_7$ (**Tableau 8**).

Tableau 8 : Effets de la co-administration du $K_2Cr_2O_7$ avec le Se et le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur le taux des bio-marqueurs du stress oxydant dans la thyroïde.

Bio-marqueurs du stress oxydant	MDA (mmol MDA/mg protein)	PC (nmol/mg of proteins)
Contrôle	0.002±0,00003	0.011±0,0006
$K_2Cr_2O_7$	0.013±0,0008***	0.015±0,0006**
$K_2Cr_2O_7$ + Se	0.007±0,0002+++	0.012±0,001++
$K_2Cr_2O_7$ + $ZnCl_2$	0.003±0,00006+++	0.011±0,0001+++
$K_2Cr_2O_7$ + Se + $ZnCl_2$	0.003±0,00003+++	0.012±0,0003+

Les valeurs sont exprimés en moyenne \pm S.D. $P \leq 0,05$ est considérée statistiquement significative, (*) significative en comparaison au control. (+) significative en comparaison au $K_2Cr_2O_7$.

2-7- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se et le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur les activités des enzymes anti-oxydantes dans la thyroïde

2-7-1- La catalase

a- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul

La catalase est l'une des enzymes anti-oxydantes qui participent activement dans la défense cellulaire contre le stress oxydatif en neutralisant le peroxyde d'oxygène (H_2O_2). Les données illustrées dans le **tableau 9** ont indiqué que $K_2Cr_2O_7$ a augmenté d'une manière hautement significative ($p \leq 0,001$) l'activité de la catalase dans l'extrait thyroïdien des rates gestantes comparativement au groupe témoin.

b- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se

Les résultats obtenus ont montré que le co-traitement avec le Se a provoqué une diminution hautement significative ($p \leq 0,001$) de l'activité de la catalase dans la thyroïde des rates gravides en comparaison avec le groupe traité par le $K_2Cr_2O_7$ (**Tableau 9**).

c- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le $ZnCl_2$

L'activité de la catalase a diminué significativement ($p \leq 0,001$) dans la thyroïde des rates gestantes co-traitées par le $ZnCl_2$ comparativement aux rates qui appartiennent au groupe traité par le $K_2Cr_2O_7$ (**Tableau 9**).

d- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association simultanée avec le Se et le $ZnCl_2$

Le co-traitement simultané avec le Se et le $ZnCl_2$ a provoqué une diminution hautement significative ($p \leq 0,001$) de l'activité enzymatique de la catalase dans le tissu thyroïdien des rates gestantes en comparaison avec le groupe traité seulement avec le $K_2Cr_2O_7$ (**Tableau 9**).

2-7-2- Le superoxyde dismutase

a- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul

Le superoxyde dismutase est un métallo-enzyme qui catalyse la dismutation des ions superoxydes en peroxydes d'hydrogène et en oxygène moléculaire afin de lutter contre l'endommagement oxydatif des biomolécules au niveau cellulaire. Les résultats obtenus ont indiqué que l'activité du SOD a augmenté significativement ($p \leq 0,001$) dans l'extrait thyroïdien des rates gestantes exposées au $K_2Cr_2O_7$ en comparaison avec le témoin (**Tableau 9**).

b- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se

Le co-traitement avec le Se n'a provoqué aucune différence significative de l'activité du superoxyde dismutase dans la thyroïde des rates gravides en comparaison avec le groupe traité par le $K_2Cr_2O_7$ seul (**Tableau 9**).

c- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le $ZnCl_2$

Le groupe co-traité par le $ZnCl_2$ seul a montré une diminution hautement significative ($p \leq 0,001$) de l'activité du superoxyde dismutase dans le tissu thyroïdien des rates gravides en comparaison avec le groupe traité par le $K_2Cr_2O_7$ (**Tableau 9**).

d- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association simultanée avec le Se et le $ZnCl_2$

L'activité enzymatique du superoxyde dismutase dans la glande thyroïde des rates gestantes a diminué d'une façon hautement significative ($p \leq 0,001$) dans le groupe co-traité par le $ZnCl_2$ et le Se à la fois comparativement au groupe traité par 10 mg/ kg. pc du $K_2Cr_2O_7$ (**Tableau 9**).

2-7-3-Le glutathion peroxydase

a- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul

Les résultats illustrés dans le **tableau 9** ont montrés que l'activité du glutathion peroxydase a augmenté significativement ($p \leq 0,001$) dans la thyroïde des rates gestantes par rapport au groupe témoin.

b- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se

La co-administration du $K_2Cr_2O_7$ avec le Se a marqué une réduction hautement significative ($p \leq 0,001$) de l'activité enzymatique du glutathion peroxydase dans l'homogénat thyroïdien des rates gravides en comparaison avec le groupe traité seulement avec le $K_2Cr_2O_7$ (**Tableau 9**).

c- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le $ZnCl_2$

Dans le groupe recevant le $K_2Cr_2O_7$ en combinaison avec le $ZnCl_2$, l'activité anti-oxydante du glutathion peroxydase dans la glande thyroïdienne des rates gestantes a marqué une diminution très significative ($p \leq 0,01$) comparativement au groupe traité par le $K_2Cr_2O_7$ (**Tableau 9**).

d- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association simultanée avec le Se et le $ZnCl_2$

L'administration concomitante du Se et du $ZnCl_2$ a réduit d'une manière hautement significative ($p \leq 0,001$) l'activité du glutathion peroxydase dans le tissu thyroïdien des rates gestantes en comparaison avec le groupe traité par le $K_2Cr_2O_7$ seulement (**Tableau 9**).

2-7-4- Le glutathion- S- transférase**a- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul**

L'administration par voie sous cutanée du $K_2Cr_2O_7$ a provoqué une augmentation hautement significative ($p \leq 0,001$) de l'activité du glutathion- S- transférase dans la glande thyroïdienne des rates gestantes comparativement avec le groupe témoin (**Tableau 9**).

b- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se

Le co-traitement des rates gestante par le Se a réduit d'une manière hautement significative ($p \leq 0,001$) l'activité du glutathion- S- transférase dans le tissu thyroïdien comparativement avec le groupe traité par la faible dose du $K_2Cr_2O_7$ (10 mg/ kg. pc) (**Tableau 9**).

c- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le $ZnCl_2$

L'administration du $K_2Cr_2O_7$ en association avec le $ZnCl_2$ a induit une diminution hautement significative ($p \leq 0,001$) de l'activité du glutathion- S- transférase dans la glande thyroïdienne des rates gestantes comparativement au groupe traité par le $K_2Cr_2O_7$ (**Tableau 9**).

d- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association simultanée avec le Se et le $ZnCl_2$

L'activité du glutathion- S- transférase dans la thyroïde des rates gestantes co-traitées simultanément par le Se et le $ZnCl_2$ a marqué une diminution hautement significative ($p \leq 0,001$) en comparaison avec le groupe traité seulement par le $K_2Cr_2O_7$ (**Tableau 9**).

Tableau 9 : Effets de la co-administration du $K_2Cr_2O_7$ avec Se et $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur les activités des enzymes anti-oxydantes dans la thyroïde.

Activités des enzymes anti-oxydantes	Control	$K_2Cr_2O_7$	$K_2Cr_2O_7 + Se$	$K_2Cr_2O_7 + ZnCl_2$	$K_2Cr_2O_7 + Se + ZnCl_2$
CAT					
($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines)	230,523 \pm 4,197	56,688 \pm 11,18***	204,119 \pm 4,289+++	163,107 \pm 14,508+++	273,632 \pm 10,851+++
SOD($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines)	1,317 \pm 0,041	2,489 \pm 0,081***	2,290 \pm 0,07	1,467 \pm 0,102+++	1,893 \pm 0,06+++
GPx ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines)	18,192 \pm 0,504	36,227 \pm 1,926***	27,931 \pm 1,029+++	29,474 \pm 0,839++	27,434 \pm 0,633+++
GST($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of protéines)	0,046 \pm 0,00008	0,18 \pm 0,003***	0,09 \pm 0,002+++	0,065 \pm 0,005+++	0,086 \pm 0,0007+++

Les valeurs sont exprimés en moyenne \pm S.D. $P \leq 0,05$ est considérée statistiquement significative, (*) significative en comparaison au control. (+) significative en comparaison au $K_2Cr_2O_7$.

2-8- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se et le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur le score total de la fragmentation d'ADN dans la thyroïde

Pour investiguer le pouvoir genotoxique, les cassures simple et double brins de l'ADN ont été estimées par le test de comètes dans notre étude (**Fig.43**).

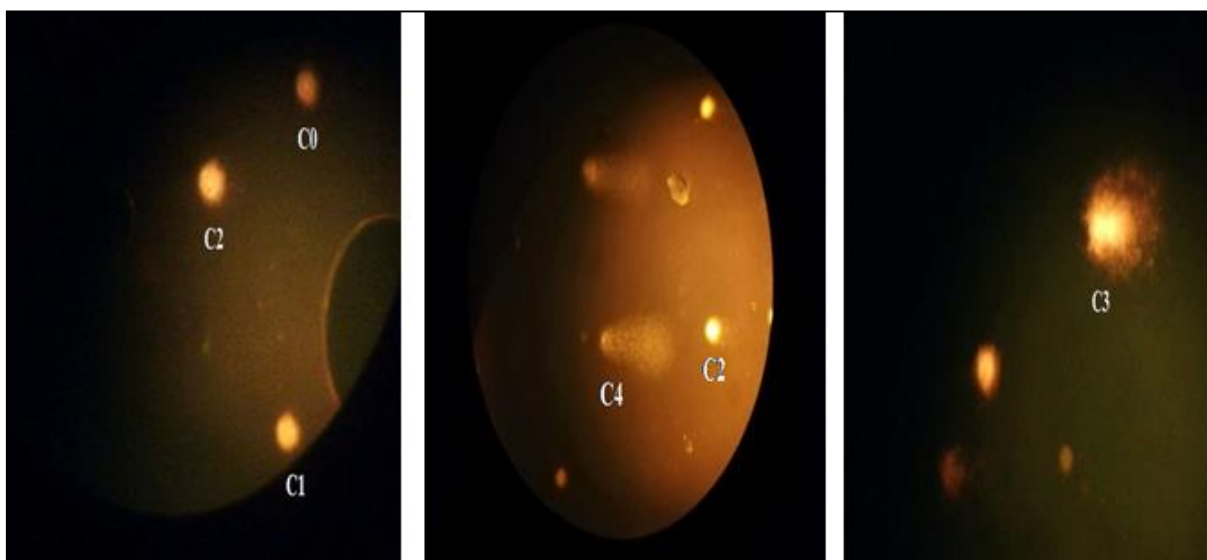


Fig. 43 Les différentes classes de comètes colorées par le BET et visualisées sous microscope à fluorescence Nikon Eclipse TE 300

a- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul

Les résultats obtenus ont montré que le traitement des rates gestantes par le $K_2Cr_2O_7$ a provoqué une induction marquée de la fragmentation d'ADN dans la glande thyroïdienne dont le score total des dommages d'ADN a augmenté significativement ($p \leq 0,001$) en comparaison avec le groupe témoin ($311 \pm 19,616$ vs. $62,167 \pm 1,835$) (**Fig.44**).

b- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se

Les rates gestantes co-traitées par le Se ont présenté une diminution très significative ($p \leq 0,01$) du score total de la fragmentation d'ADN dans le tissu thyroïdien ($277,833 \pm 13,367$ vs. $311 \pm 19,616$) comparativement au groupe traité par le $K_2Cr_2O_7$ (**Fig.44**).

c- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le $ZnCl_2$

Le co-traitement avec le $ZnCl_2$ a atténué le pouvoir genotoxique du $K_2Cr_2O_7$. En effet, les résultats obtenus dans la **Fig.44** ont montré que le taux des dommages à l'ADN dans le tissu thyroïdien des rates gestantes a diminué d'une manière hautement significative ($p \leq 0,001$) dont le score total obtenu est de $210,833 \pm 20,576$ vs. $311 \pm 19,616$ en comparaison avec le groupe traité seulement avec le $K_2Cr_2O_7$.

d- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association simultanée avec le Se et le $ZnCl_2$

L'administration du $K_2Cr_2O_7$ en combinaison avec le se et le $ZnCl_2$ simultanément a diminué significativement ($p \leq 0.05$) le taux de la fragmentation génomique dans la glande thyroïde des rates gestantes ($282,833 \pm 13,408$ vs. $311 \pm 19,616$) comparativement au groupe traité par le $K_2Cr_2O_7$ (**Fig.44**).

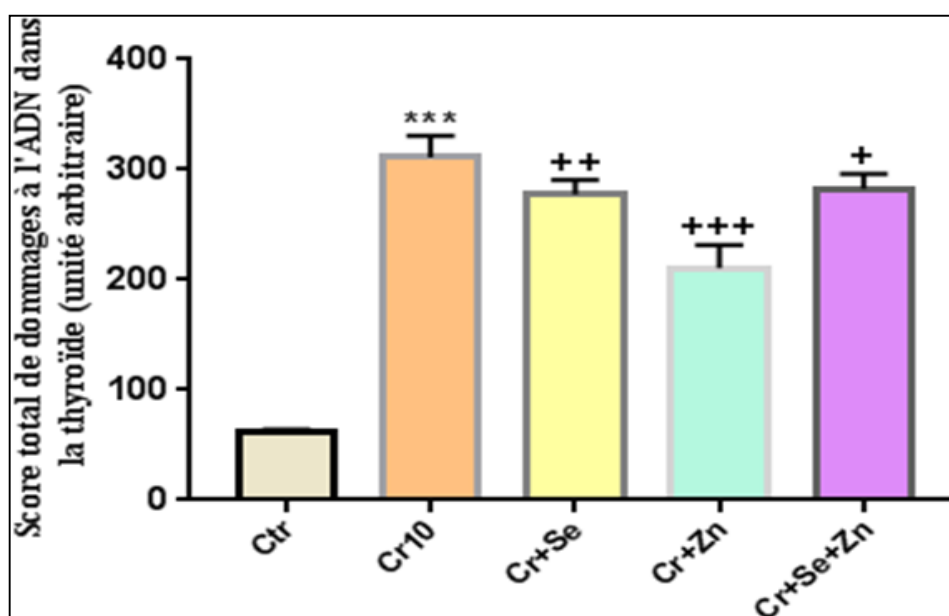


Fig.44 Effets de la co-administration du $K_2Cr_2O_7$ avec le Se, le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur le score total de la fragmentation d'ADN dans la thyroïde. Les valeurs sont exprimés en moyenne \pm S.D. $P \leq 0,05$ est considérée statistiquement significative, (*) significative en comparaison au control. (+) significative en comparaison au $K_2Cr_2O_7$.

2-9- Induction de la fragmentation d'ADN et la formation des micronoyaux dans la moelle osseuse

2-9-1- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se et le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur le score total de la fragmentation d'ADN dans la moelle osseuse

a- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul

Les résultats obtenus ont indiqué que l'administration du $K_2Cr_2O_7$ par voie sous-cutanée a provoqué d'une manière hautement significative ($p \leq 0,001$) la fragmentation d'ADN dans les cellules de la moelle osseuse des rates gestantes. Ainsi, le score total a augmenté ($231,33 \pm 11,978$ vs. $69 \pm 6,812$) en comparaison avec le groupe témoin (**Fig.45**).

b- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se

Le co-traitement avec le Se a diminué le score total de dommages à l'ADN d'une manière hautement significative ($p \leq 0,001$) dans la moelle osseuse des rates gestantes ($176,667 \pm 10,857$ vs. $231,33 \pm 11,978$) en comparaison avec le groupe traité seulement par le $K_2Cr_2O_7$ (**Fig.45**).

c- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le $ZnCl_2$

Le groupe co-traité par le $ZnCl_2$ a présenté une diminution hautement significative ($p \leq 0,001$) du taux de la fragmentation de l'ADN ($167,667 \pm 12,675$ vs. $231,33 \pm 11,978$) dans les cellules de la moelle osseuse en comparaison avec le groupe traité par le $K_2Cr_2O_7$ (**Fig.45**).

d- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association simultanée avec le Se et le $ZnCl_2$

Le co-traitement des rates gestantes concomitamment par le Se et le $ZnCl_2$ a diminué significativement ($p \leq 0,05$) le taux de la fragmentation génomique dans les cellules de la moelle osseuse ($192,5 \pm 8,62$ vs. $231,33 \pm 11,978$) en comparaison avec le groupe traité par le $K_2Cr_2O_7$ (**Fig.45**).

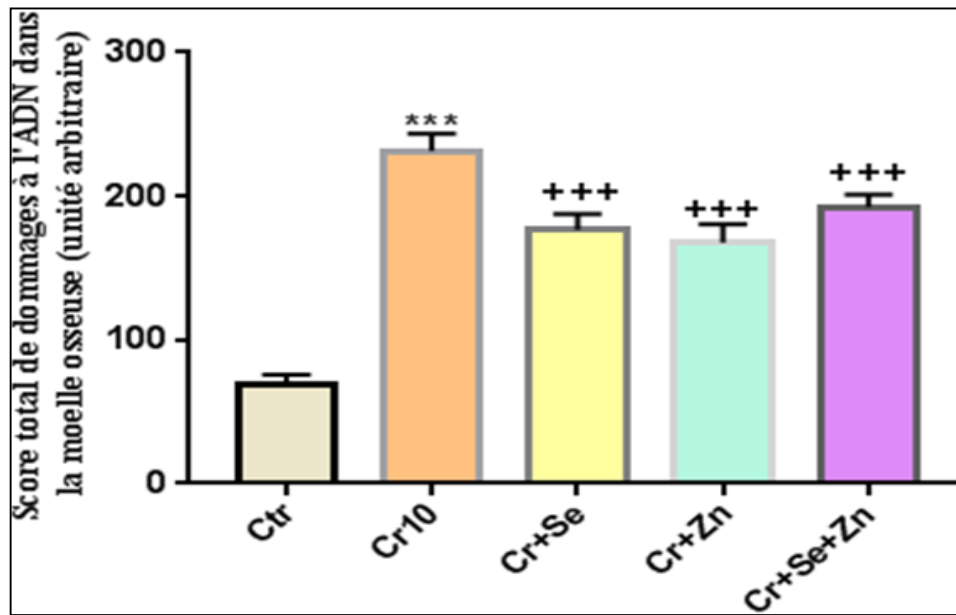


Fig.45 Effets de la co-administration du $K_2Cr_2O_7$ avec le Se, le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur le score total de la fragmentation d'ADN dans la moelle osseuse. Les valeurs sont exprimés en moyenne \pm S.D. $P \leq 0,05$ est considérée statistiquement significative, (*) significative en comparaison au control. (+) significative en comparaison au $K_2Cr_2O_7$.

2-9-2- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se et le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur l'induction des micronoyaux dans la moelle osseuse

a- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul

Les données présentées dans la **Fig.46** ont montré que le traitement des rates gestantes par le $K_2Cr_2O_7$ a induit significativement ($p \leq 0,001$) la formation des micronoyaux (MN) dans les érythrocytes poly-chromatiques (PCE). Ainsi, le nombre de PCEMNs a été augmenté ($130,5 \pm 11,149$ vs. $30,333 \pm 3,777$) en comparaison avec le groupe contrôle.

b- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se

Le nombre de PCEMNs a été diminué significativement ($p \leq 0,05$) dans la moelle osseuse des rates gestantes co-traitées par le Se ($110 \pm 6,325$ vs. $130,5 \pm 11,149$) comparativement au groupe traité par le $K_2Cr_2O_7$ (**Fig.46**).

c- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le $ZnCl_2$

Le co-traitement avec le $ZnCl_2$ a provoqué une diminution significative ($p \leq 0,05$) du nombre de PCEMNs dans la moelle osseuse des rates gestantes ($117,33 \pm 7,005$ vs. $130,5 \pm 11,149$) comparativement au groupe traité par le $K_2Cr_2O_7$ (**Fig.46**).

d- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association simultanée avec le Se et le $ZnCl_2$

Les résultats obtenus ont indiqué que la co-administration simultanée du Se et du $ZnCl_2$ a atténué l'effet myélotoxique du $K_2Cr_2O_7$. En effet, le nombre de PCEMNs a diminué significativement ($p \leq 0,05$) dans la moelle osseuse des rates gestantes ($117,167 \pm 8,256$ vs. $130,5 \pm 11,149$) en comparaison avec le groupe traité par le $K_2Cr_2O_7$ (**Fig.46**).

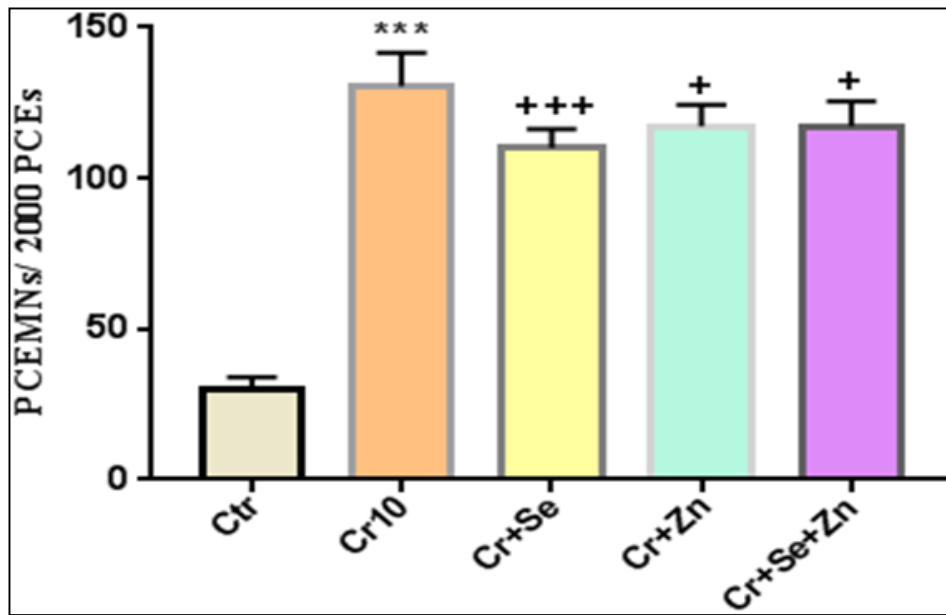
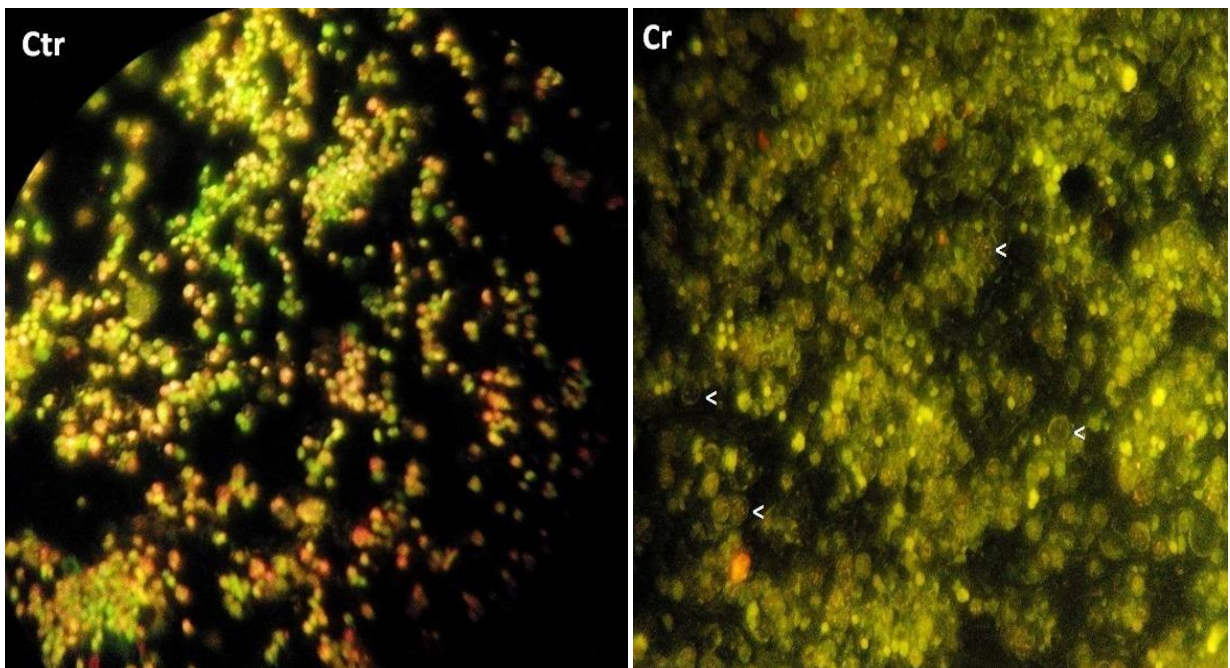
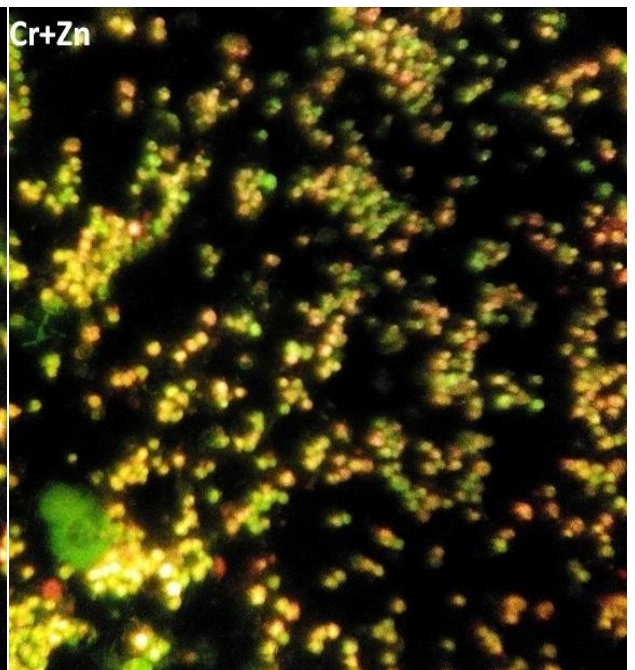
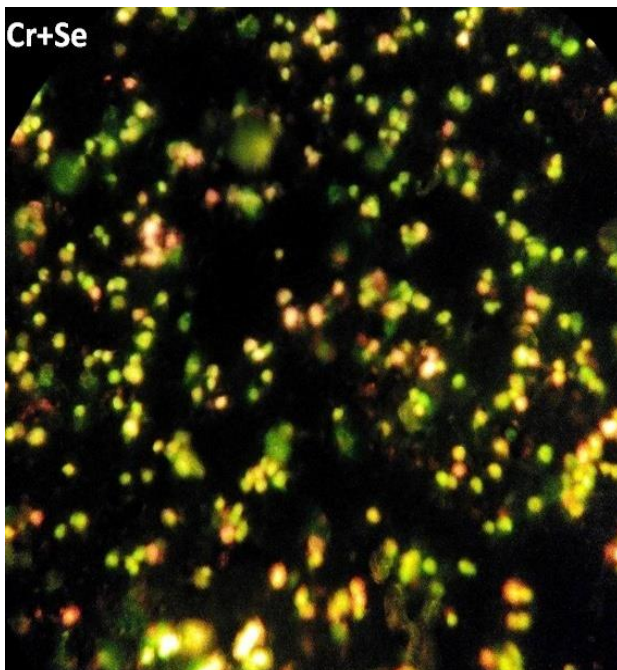
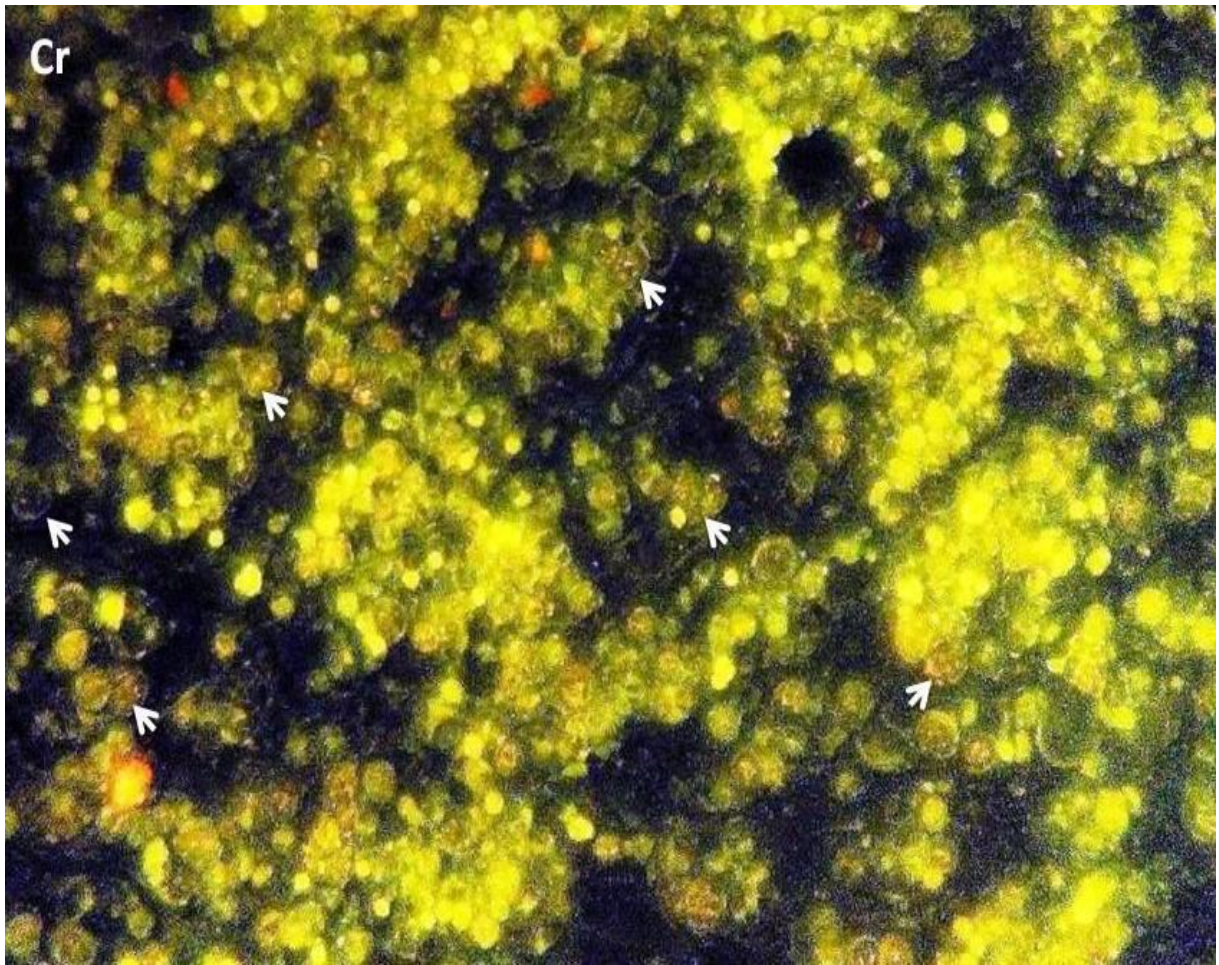


Fig.46 Effets de la co-administration du $K_2Cr_2O_7$ avec le Se, le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur l'induction de micronoyaux dans la moelle osseuse. Les valeurs sont exprimés en moyenne \pm S.D. $P \leq 0,05$ est considérée statistiquement significative, (*) significative en comparaison au control. (+) significative en comparaison au $K_2Cr_2O_7$.

La visualisation microscopique (microscope à fluorescence) des PCE (cellules fluorescentes rouges), NCE (cellules fluorescentes vertes) et PCEMNs (globules rouges évanouis avec des taches fluorescentes jaunes) est illustrée dans la **Fig.47**.





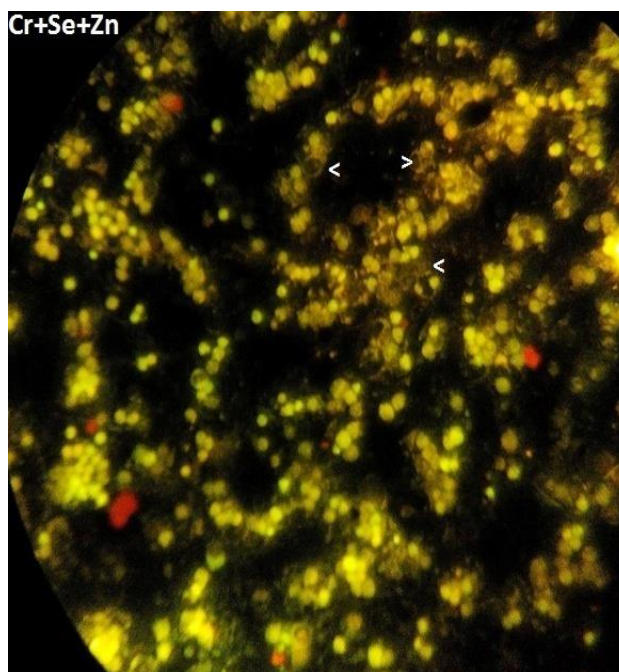


Fig.47 La visualisation des PCE (cellules fluorescentes rouges), NCE (cellules fluorescentes vertes) et PCEMNs (globules rouges évanouis avec des taches fluorescentes jaunes : tête de flèche) sous microscope à fluorescence (Nikon, Japon).

2-9-3- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se et le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur l'induction de la cytotoxicité dans la moelle osseuse

a- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul

Afin d'évaluer le potentiel cytotoxique du $K_2Cr_2O_7$ dans la moelle osseuse des rates gestantes, le nombre de érythrocytes poly-chromatiques par l'ensemble de 1000 érythrocytes poly-chromatiques et normo- chromatiques a été estimé. Les résultats obtenus dans la **Fig.48** ont indiqué que le $K_2Cr_2O_7$ a provoqué une diminution hautement significative ($p \leq 0,001$) des érythrocytes poly-chromatiques ($151,667 \pm 11,325$ vs. $269,167 \pm 13,303$) en comparaison avec le groupe témoin.

b- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le Se

Le co-traitement avec le Se a atténué la cytotoxicité dans la moelle osseuse des rates gestantes en augmentant d'une manière significative ($p \leq 0,05$) le nombre de PCEs ($188,33 \pm 19,664$ vs. $151,667 \pm 11,325$) en comparaison avec le groupe traité par le $K_2Cr_2O_7$ (**Fig.48**).

c- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association avec le $ZnCl_2$

Le nombre des érythrocytes poly-chromatiques a marqué une augmentation significative ($p \leq 0,05$) dans la moelle osseuse des rates gestantes co-traitées par le $ZnCl_2$ ($186 \pm 32,056$ vs. $151,667 \pm 11,325$) comparativement au groupe traité par le $K_2Cr_2O_7$ (**Fig.48**).

d- L'effet de l'administration du $K_2Cr_2O_7$ seul ou en association simultanée avec le Se et le $ZnCl_2$

Le co-traitement concomitant avec les deux oligo-éléments, le Se et le $ZnCl_2$ n'a provoqué aucune différence significative du nombre de PCEs dans la moelle osseuse des rates gestantes en comparaison avec le groupe traité par le $K_2Cr_2O_7$ (**Fig.48**).

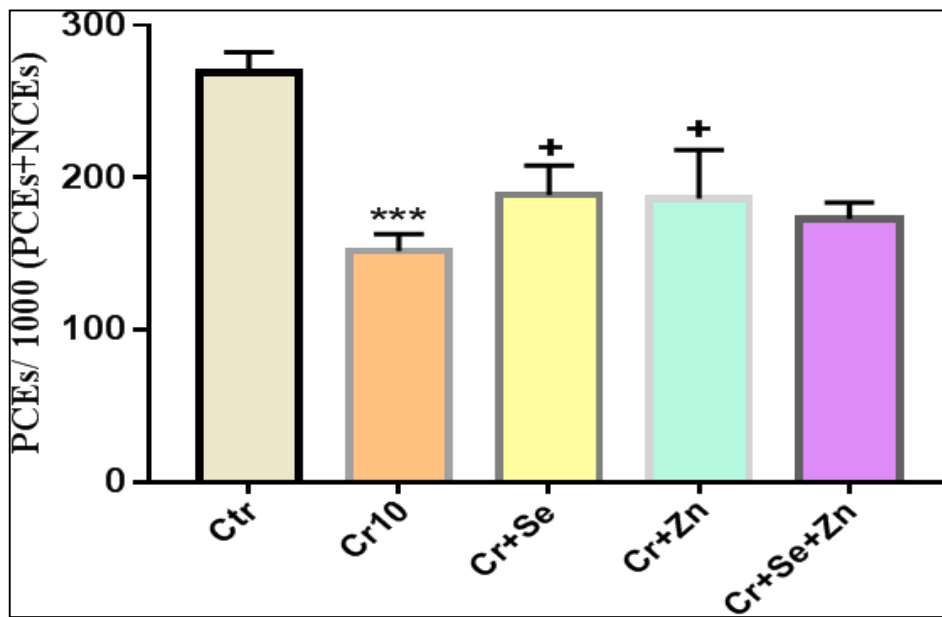


Fig.48 Effets de la co-administration du $K_2Cr_2O_7$ avec le Se, le $ZnCl_2$ ou les deux simultanément sur l'induction de la cytotoxicité dans la moelle osseuse. Les valeurs sont exprimés en moyenne \pm S.D. $p \leq 0,05$ est considérée statistiquement significative, (*) significative en comparaison au control. (+) significative en comparaison au $K_2Cr_2O_7$.



DISCUSSION

1- Discussion

Les métaux lourds sont des éléments toxiques, non biodégradables et persistants dans l'environnement (**Hamdy et al., 2018**). Leurs multiples utilisations industrielles, domestique, agricole, médicale et technologique provoquent des effets toxiques sur la santé humaine et l'environnement (**Tchounwou et al., 2012**). En plus de leurs effets hépatotoxique (**Renu et al., 2021**), néphrotoxique (**Avila-Rojas et al., 2018**), hématotoxique (**Adjroud 2009 ; 2010**), neurotoxique (**Travacio et al., 2000**) et reprotoxique (**Acharya et al., 2006 ; Adjroud 2013**), les métaux lourds peuvent agir comme des perturbateurs endocriniens et altèrent la biosynthèse, la sécrétion, la biodisponibilité, le transport, le métabolisme et l'action biologique des hormones (**Rana 2014**). En effet, la structure et les mécanismes moléculaires impliqués dans la fonction endocrine de l'hypophyse, les surrénales, la thyroïde, le pancréas et les gonades sont affectés par plusieurs métaux lourds y compris le plomb, le cadmium, le chrome, le manganèse et le mercure (**Fernicola et al., 1985**).

Parmi ces métaux lourds, le chrome hexavalent est désigné comme un polluant environnemental et un agent toxique incriminé dans l'altération des fonctions biologiques de l'organisme. En plus, il est considéré comme un perturbateur endocrinien (**Jarup 2003**). En effet, la présente étude a été consacrée en premier lieu pour la mise en évidence de l'effet toxique et perturbateur sur la fonction thyroïdienne des rates gestantes exposées au chrome hexavalent et en second lieu des effets protecteurs du sélénium et zinc contre cette thyrotoxicité, tant que des éléments essentiels ayant des propriétés anti-oxydantes et chemoprotectrices. Pour cette raison, l'évaluation des paramètres hormonaux, histologiques et moléculaires a été performée dans cette étude pour répondre à la problématique posée dans l'introduction.

D'après nos résultats, le poids de la thyroïde a augmenté d'une manière significative par rapport au groupe témoin, ce changement est corrélé à l'hypertrophie de la glande et des cellules épithéliales observée lors de l'examen microscopique dans la présente étude. Conformément, plusieurs perturbateurs thyroïdiens incluant le méthimazole, les sulfamides et le thiazole ont provoqué une augmentation du poids absolu de la thyroïde (**Ben Amara et al., 2009 ; Nishikawa 1983 ; Yang et al., 2013**).

En outre, la détermination du poids corporel maternel et de la thyroïde est parmi les paramètres principaux dans l'évaluation de la toxicité engendrée par les xéno-biotiques (**Crissman et al., 2004**). Les résultats de l'évaluation pondérale des rates gestantes exposées

au $K_2Cr_2O_7$ ont révélé que ce dernier a provoqué une diminution significative du poids corporel des rates suite à l'administration sous-cutanée des trois doses croissantes du $K_2Cr_2O_7$ dont l'effet le plus marquant est observé avec la plus faible dose. En effet, cette diminution peut être attribuée soit à la réduction de la consommation alimentaire observée chez nos rates ou à l'action toxique du chrome sur le métabolisme énergétique cellulaire (**Ben Hamida et al., 2013 ; Debeto et Luciani 1988**). En plus, tant que les hormones thyroïdiennes favorisent la croissance, la diminution du poids corporel maternel peut être liée à l'hypothyroïdie induite par le $K_2Cr_2O_7$ observée dans la présente étude. De même, une diminution du poids corporel est rapportée chez des rates pré-implantées exposées au $NiCl_2$, ainsi que des souris femelles intoxiquées par le $K_2Cr_2O_7$ (**Adjroud 2013 ; Ben Hamida et al., 2013**).

La glande thyroïdienne est encline à la toxicité des métaux lourds (**De Lima junior et al., 2021, Boas et al., 2006 ; Hassanin et al., 2013**). Dans la présente étude, l'estimation des concentrations plasmatiques des hormones thyroïdiennes et la TSH montre que le $K_2Cr_2O_7$ est susceptible d'altérer la fonction thyroïdienne chez la rate pré-implantée. En effet, l'administration sous-cutanée des doses croissantes du $K_2Cr_2O_7$ a induit une hypothyroïdie périphérique, caractérisée par une diminution significative des taux plasmatiques de la T3 et de la T4 et associée à une augmentation significative de la concentration plasmatique de la TSH due au feed-back positif, malgré le fait qu'au cours de la gestation, le statut hormonal thyroïdien maternel témoigne d'une hyperthyroïdie gestationnelle résultante de l'adaptation aux besoins métaboliques issus de la présence des tissus fœtaux et placentaires (**Johns et al., 2018**).

Conformément à nos résultats, plusieurs travaux ont montré que l'exposition au $K_2Cr_2O_7$ a induit une hypothyroïdie en perturbant les concentrations circulantes en T3, T4 et la TSH chez les rats mâles *Albinos Wistar* (**ElBakry and Tawfik 2014 ; Mahmood et al., 2010**). Par ailleurs, d'autres études similaires utilisant d'autres perturbateurs endocriniens pour montrer la contribution de la thyroïde maternelle pendant la grossesse, rapportent que l'exposition *in utero* au tributylétain, un leurre hormonal puissant, est capable de réduire les niveaux sériques de la T3 et de la T4 chez les rates gestantes, ce qui a entraîné une diminution du poids des fœtus ainsi que une ossification retardée du squelette fœtale (**Adeeko et al., 2003**). De même, des rates traitées par le tributylétain montrent une chute très marquée des concentrations sériques en T3 et en T4 chez les ratons mâles nouveaux-nés (**Cooke et al.,**

2004). Par ailleurs, le cadmium, un autre métal lourd toxique semble provoquer une diminution du taux sérique de la T4 et une élévation non significative de la concentration sérique en TSH chez les rates *Wistar* (Pilat-Marcinkiewicz *et al.*, 2003).

En plus de son effet perturbateur sur l'hormonogénèse thyroïdienne, il s'est avéré que l'adéno-hypophyse peut être une cible de la toxicité du CrVI *in vivo* et *in vitro*, en affectant la fonction endocrinienne de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (Quinteros *et al.*, 2007). Ainsi, cette perturbation hormonale peut être expliquée par le pouvoir oxydant du CrVI. En effet, les thyrocytes sont censés être très sensibles aux altérations de l'homéostasie du réticulum endoplasmique en raison de leur fonction sécrétoire. Par conséquent, l'expression des gènes impliqués dans l'hormonogénèse thyroïdienne, ainsi que leurs régulateurs transcriptionnels est inhibée au niveau des thyrocytes lorsque le réticulum endoplasmique subit un stress oxydatif, ce qui aboutit à la déplétion de la synthèse hormonale (Wen *et al.*, 2017).

De même, la diminution de la concentration plasmatique de la thyroxine détectée dans notre étude peut être due à l'inhibition de sa synthèse par la glande thyroïdienne de la rate pré-implantée. Ainsi, parmi les étapes les plus essentielles qui participent à la synthèse de cette hormone, la capture d'ions iodure par les cellules folliculaires via le symporteur NIS (Na^+/I). En effet, la capture d'iodures peut être encline aux perturbateurs thyroïdiens qui peuvent influencer l'expression des gènes codants pour le NIS ainsi que l'absorption d'iodure (Boas *et al.*, 2006). Pour cette raison, la teneur en iode intra-thyroïdien est considérée comme un facteur limitant de l'hormonogénèse thyroïdienne. En effet, même une surcharge en iode peut également épuiser l'expression du NIS et diminuer les activités de la TPO et les DIO, entraînant ainsi une hypothyroïdie telle que observée chez nos rates (Leung et Braverman 2014).

Par ailleurs, l'administration du méthimazole semble avoir un effet thyrostatique sur le symporteur NIS ainsi que la capture d'iodure, résultant dans la diminution du pool d'iode intra-thyroïdien en altérant sa capture dans la thyroïde des rates allaitantes *Albinos Wistar* (Ben Amara *et al.*, 2009). De plus, le propylthiouracile et le perchlorate engendrent une diminution de la teneur en iode thyroïdien chez la souris en période d'allaitement (Ben Hamida *et al.*, 2001). En outre, L'effet hypothyroïdien du méthimazole peut être attribué aussi à son action inhibitrice sur la TPO qui catalyse l'iodation des tyrosines de la

thyroglobuline (**Dorea 2002**). Ainsi, le méthimazole agit comme un substrat pour la TPO en rivalisant avec la thyroglobuline. Une fois iodé, il est métabolisé par voie extra-thyroïdienne en épuisant le stock d'iode de la glande (**Mitchell et Pearce 2019**).

En plus de cela, la diminution du taux plasmatique de la T4 dans notre étude peut être également expliquée par le dysfonctionnement des enzymes clés impliquées dans l'hormonogénèse thyroïdienne. En effet, plusieurs produits chimiques y compris les benzophénones, les hydrocarbures aromatiques polycycliques et les polluants organiques persistants ont perturbé l'activité de la TPO humaine *in vitro* (**Song et al., 2012**). L'inactivation de la TPO et la DUOX se produit quand le H₂O₂ est massivement généré via le stress oxydatif, en modifiant leur structure conformationnelle ce qui mène par la suite à l'abaissement de leurs activités catalytiques (**Fortunato et al., 2010**). De plus, le cadmium, un perturbateur thyroïdien puissant est capable d'altérer l'expression des gènes liés à l'axe hypothalamo- hypophyso- thyroïdien en augmentant la transcription de l'ARN messagers de la TSH et la thyroglobuline d'un part et en diminuant l'expression des récepteurs des hormones thyroïdiennes ThR β et ThR α chez les poissons d'autre part (**Li et al., 2014**). Pareillement, plusieurs études ont suggérés que le cadmium affecte la production et /ou la sécrétion de la T4 par l'induction des désordres de la phosphorylation oxydative mitochondriale des thyrocytes (**Hammouda et al., 2008 ; Prakash et al., 1997 ; Yoshizuka et al., 1991**).

La baisse des taux plasmatiques de T3 démontrée par notre étude suggère que le K₂Cr₂O₇ a influencé négativement les enzymes impliquées dans le métabolisme extra-thyroïdien des hormones thyroïdiennes telles que la 5' mono-deiodinase, qui catalyse la conversion de la T4 en T3 active. Cela pu être confirmé par des études antérieures sur des rats et des souris traités par le cadmium (**Chaurasia et al., 1996 ; Gupta et al., 1997**). Par conséquent, l'inhibition de la 5' mono- deiodinase est associée à la peroxydation lipidique induite par le cadmium. Cette dernière affecte l'intégrité membranaire de la cellule, y compris les sites de liaison à l'enzyme (**Chaurassia et al. 1996**). Considérant que la 5'deiodinase I ; l'enzyme responsable principalement de la production de la T3 circulante est d'origine hépatique, les lésions oxydatives du foie induites par le CrVI peuvent être associées à la déplétion du taux plasmatique de la T3 révélée par nos résultats (**Soudani et al., 2011**).

L'altération de l'hormonogénèse thyroïdienne observée dans la présente étude concorde avec les lésions structurelles de l'histoarchitecture et la taille de la glande thyroïdienne ainsi que la

chute du poids corporel maternel. De même, l'intoxication subaiguë des rats *Albinos Wistar* mâles et femelles par les doses croissantes du plomb a provoqué l'altération du profil hormonal et structurel de la thyroïde ainsi que des changements dans les capacités d'apprentissage et du mémoire (**De Lima Junior et al., 2021**). En effet, le traitement des rates gestantes avec les trois doses croissantes du $K_2Cr_2O_7$ a altéré fortement la structure histologique de la glande thyroïdienne. Ainsi, le parenchyme thyroïdien est apparu très désorganisé, avec des inégalités du diamètre et de la forme des follicules. La présence de micro-follicules est plus prépondérante que les follicules les plus larges dans les deux régions centrale et périphérique de la glande. Ces résultats confortent d'autres études précédentes (**Mahmood et al., 2010 ; ElBakry and Tawfik 2014**).

De plus, l'administration des trois doses croissantes du $K_2Cr_2O_7$ chez les rates pré-implantées a induit l'interruption des membranes folliculaires, ce qui a conduit à leur effondrement. Le colloïde qui emmagasine les hormones thyroïdiennes; a apparu dilué et considérablement réduit, vacuolisé et rempli de cellules folliculaires exfoliées. Ces altérations ont été plus prononcées dans le groupe traité par la faible dose du $K_2Cr_2O_7$ et coïncident avec les résultats rapportés par **ElBakry et Tawfik (2014)**.

Par ailleurs, en raison de la dégénérescence et l'effondrement des follicules ainsi que la réduction de la région folliculaire, l'espace inter-folliculaire a apparu plus large que la normale. Cet élargissement est observé dans la thyroïde des rats mâles, des rates et des souris femelles non gestantes ; traités respectivement par le $K_2Cr_2O_7$ (**Hala et al., 2016**), l'aluminium (**Aktac and Bakar 2002**) et le cadmium (**Pilat-Marcinkiewicz et al., 2003**). Une autre étude examinant les effets toxiques du CrVI sur la thyroïde du rat a révélé les mêmes altérations histologiques que celles observées chez nos rates gestantes ; la présence d'irrégularités et des follicules moins bien ordonnés et affaiblis est observée (**Mahmood et al., 2010**).

Concernant les thyrocytes, elles sont apparues hypertrophiques et fortement vacuolées et remplis de gouttelettes de résorption, leur hauteur semblait être augmentée notamment dans le groupe traité par la faible dose du $K_2Cr_2O_7$. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par **Hala et al. (2016)** et **Khalaf et Arafat (2015)**. L'hypertrophie des thyrocytes peut être liée notamment au stress oxydatif, les dommages de l'ADN et la modulation du gène régulateur apoptotique p53 causés par la toxicité du CrVI (**Bagchi et al., 2002**). En plus, elle est plus probablement due à l'augmentation de la concentration plasmatique circulante de la

TSH pour compenser l'hypothyroïdie périphérique induite par l'exposition au $K_2Cr_2O_7$ comme le révèle notre étude (**McNabb 1992**). En effet, la TSH est le stimulus principal de l'hormonogénèse thyroïdienne. Ainsi, l'hyperstimulation de l'épithélium folliculaire thyroïdien par la TSH peut entraîner l'hypertrophie des thyrocytes (**Gaïde Chevronnay et al., 2015**).

D'après les résultats démontrés au dessus, la dose la plus faible du $K_2Cr_2O_7$ a induit des effets toxiques significatifs et plus prononcés sur la thyroïde des rates gestantes que les doses les plus élevées; ces résultats sont en accord avec le fait que les perturbateurs endocriniens peuvent exercer des effets plus puissants à faibles doses (**Vom Saal et al., 2003**).

En raison de sa grande capacité de diffusion, le CrVI pénètre aisément dans les compartiments cellulaires à travers des échangeurs du phosphate et sulfate à cause de sa similitude structurelle avec ces anions. En conséquence, il s'accumule et persiste dans plusieurs organes après l'exposition, ce qui favorise l'occurrence d'une multitude d'altérations tissulaires et physiologiques liées à son pouvoir toxique (**Cohen et al., 1993**).

D'autre part, l'exposition par voie sous-cutanée chez les rates gestantes a favorisé la bioaccumulation du Cr dans la glande thyroïdienne, ce qui concorde avec les résultats obtenus par **Mahmood et al. (2008)** qui ont confirmé l'accumulation du Cr dans la thyroïde des rats mâles, dans le cerveau des souris femelles (**Travacio et al., 2000**), le rein et le foie des rats *Wistar* mâles (**Kotyzova et al., 2015**) et dans les tissus cérébral, cardiaque, rénal, hépatique et testiculaire des caïlles japonaises mâles (**Suljević et al., 2020**).

La caspase-3 est l'une des caspases exécutrices; elle participe au processus de la protéolyse qui conduit à l'apoptose (**Poreba et al., 2013**). Les résultats obtenus dans cette étude ont révélé que l'administration de la faible dose du $K_2Cr_2O_7$ a significativement élevé l'activité de la caspase-3 dans la thyroïde des rates *Wistar* gestantes, cette induction confirme les propriétés apoptotiques des composés du CrVI. En effet, nos résultats concordent avec une étude récente menée par **ElBakry et Tawfik (2014)**, les auteurs ont détecté l'apoptose dans la thyroïde des rats exposés au $K_2Cr_2O_7$ via l'oppression de l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) ce qui a conduit à l'induction de la mort cellulaire programmée. Ainsi, la détection de l'apoptose via la voie de la caspase-3 dans notre travail peut être expliquée selon plusieurs études. **Bagchi et al., 2001** rapportent que le mécanisme de la toxicité du Cr est basé sur l'induction de l'apoptose, l'augmentation du cytochrome C mitochondrial et la surexpression des molécules pro-apoptotiques (**Banu et al., 2011**). D'autres chercheurs ont

précisé que le CrVI a la tendance de se bio-accumuler dans l'hypothalamus et la glande pituitaire, en engendrant l'apoptose par la voie de la caspase-3 et en exerçant ainsi un impact délétère sur la fonction endocrinienne de l'axe hypothalamo-hypophysaire (**Nudler et al., 2009**).

L'induction de l'activité de la caspase-3 dans la thyroïde des rates pré-implantées observée dans la présente étude peut être attribuée à la perturbation de la fonction mitochondriale induite par le CrVI. En effet, ce dernier a provoqué l'augmentation de la perméabilité de la membrane mitochondriale et la libération du facteur inducteur de l'apoptose et le cytochrome C, ce qui a conduit à l'induction de l'activité de la caspase-3 et l'apoptose *in vitro* dans les hépatocytes humaines (**Ma et al., 2020**).

Le CrVI est un agent oxydant très puissant dont sa réduction intracellulaire génère des dérivés intermédiaires réactifs et induit une production excessive des espèces réactive de l'oxygène, qui à leur tour altèrent l'homéostasie cellulaire et réagissent avec les lipides, les protéines et l'ADN, ce qui conduit à l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Pour cette raison, le stress oxydatif est considéré parmi les voies majeures impliquées dans l'induction des effets toxiques du CrVI (**Mishra et Bharagava 2016 ; Winczura et al., 2012**). En effet, la présente étude a révélé que la faible dose du $K_2Cr_2O_7$ a induit un stress oxydatif thyroïdien chez des rates *Albinos Wistar* gravides, en induisant la peroxydation lipidique, la carbonylation des protéines et la fragmentation d'ADN, et en perturbant les activités des enzymes responsables de la défense anti-oxydante cellulaire, notamment le SOD, la CAT, le GPx et le GST.

Par ailleurs, le déséquilibre entre la production des espèces réactives à l'oxygène et la capacité cellulaire de piéger et de neutraliser ces métabolites réactifs ou à réparer les dommages encourus est défini par le stress oxydatif. Ce dernier est impliqué dans le développement d'un large éventail de maladies, y compris le cancer (**Favier 2006**). Il est intéressant de noter que l'augmentation des dommages oxydatifs des macromolécules dans la glande thyroïde lors de l'exposition à des agents pro-oxydants exogènes ou endogènes est considérée comme un contributeur substantiel au développement de différentes maladies thyroïdiennes (**Karbownik-Lewinska et Kokoszko-Bilska 2012**).

La peroxydation lipidique est initié par une l'attaque radicalaire d'espèces réactives de l'oxygène sur les acides gras polyinsaturés, des constituants majeurs de la bicouche lipidique des membranes cellulaires. Cette réaction radicalaire se passe en cascade des processus d'oxydation consécutives en produisant en premier temps ; des peroxydes lipidiques instables

qui sont ensuite convertis en composés carbonylés plus stables, parmi lesquels le malondialdéhyde (**Grotto et al., 2009**). Nous rapportons dans notre étude que l'administration sous-cutanée de la faible dose du $K_2Cr_2O_7$ a induit la peroxydation lipidique détectée par des taux élevés du MDA dans les extraits protéiques des thyroïdes des rates gestantes *Albinos Wistar*. En effet, le pouvoir peroxydatif du $K_2Cr_2O_7$ est confirmé par plusieurs investigations où il a été noté que le $K_2Cr_2O_7$ a induit un stress oxydatif via le dysfonctionnement mitochondrial et l'épuisement du système de défense antioxydant du tissu hépatique (**Garcia-Nino et al., 2013**). En plus, à l'appui de nos résultats, de nombreux auteurs ont rapportés des taux élevés des peroxydes lipidiques après l'exposition au CrVI dans plusieurs tissus des rats, des souris et des lapins *Oryctolagus Cuniculus* (**Chandra et al., 2007 ; Travacio et al., 2000 ; Saber et al., 2015 ; Mary-Momo et al., 2019**).

Dans ce contexte, ces résultats peuvent être expliqués par la formation amplifiée de radicaux hydroxyles hautement réactifs issue de l'intoxication par le CrVI ; ces radicaux sont responsables par la suite de l'initiation du processus peroxydatif des lipides (**Valko et al., 2005**). En revanche, les ions métalliques exacerbent l'oxydation des acides gras polyinsaturés au moyen des ERO générés ; ils attaquent les acides gras des membranes cellulaires en induisant leur peroxydation, ce qui conduit à une détérioration structurelle et fonctionnelle de la membrane cellulaire (**Sole et al., 1990 ; Zhang et al., 2009**).

Les protéines peuvent assurer une multitude de fonctions cellulaires au sein de l'organisme. Cependant, elles sont des cibles majeures de l'attaque oxydante des radicaux libre et les ERO, surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH). L'oxydation protéique conduit à la détérioration structurelle des protéines par la formation des ponts tyrosine-tyrosine et les groupements carbonyles, des coupures et des modifications de certains acides aminés. Cette modification oxydative provoque l'inactivation de propriétés biologiques des protéines notamment les enzymes, protéines de transport et les récepteurs. En outre, la carbonylation des protéines peut être le résultat de l'attaque radicalaire ou bien l'interaction des espèces carbonyles produites lors de la décomposition oxydative des acides gras polyinsaturés dont le produit terminal le plus réactif et cytotoxique est le MDA (**Suzuki et al. 2010 ; Poli et al. 2008**). Selon notre travail expérimental, le traitement des rates gestantes par le $K_2Cr_2O_7$ a augmenté le taux des protéines carbonylées dans la glande thyroïdienne. Aussi, la carbonylation des protéines est le résultat de leur modification oxydative par les radicaux libres, ce qui mène à la perte de leur intégrité structurelle et à l'altération de leur activité catalytique (**Stadtman et Levine 2006**). Cela pourrait être attribué au stress oxydatif induit

par les métaux lourds, qui est considéré comme l'une des voies principales incriminée dans la perturbation de l'homéostasie des protéines (**Winterbourn et Hampton 2008**). En effet, l'induction de la carbonylation protéique observée dans notre étude peut être liée à la capacité du CrVI de provoquer des dommages oxydatifs aux protéines ; en affectant la traduction de l'ARN messenger qui résulte dans l'élaboration des protéines d'une structure défectueuse (**Holland et al., 2007 ; Sumner et al., 2005**). Le rôle physiopathologique de la carbonylation protéique a été mis en évidence dans le développement et la progression de plusieurs maladies telles que l'Alzheimer et le dysfonctionnement de muscles squelettiques associé aux atteintes pulmonaires obstructives (**Favier 2003**).

Outre le large spectre des effets néfastes des ERO, les dérivés réduits intermédiaires du CrVI peuvent favoriser l'oxydation directe des résidus d'acides aminés constituant des différentes protéines et peptides ; en réagissant avec le peroxyde d'hydrogène, entraînant ainsi la formation des protéines carbonylées (**Mattagajasingh et al., 2008**). En effet, plusieurs études ont corroborés nos résultats, elles ont décrit que le traitement par le CrVI a augmenté les taux des peroxydes lipidiques et des protéines carbonylées au niveau cellulaire ; respectivement dans les érythrocytes humains et le tissu rénal de rates *AlbinosWistar* (**Ahmad et al., 2011 ; Pedraza-Chaverri et al., 2008**).

La thyroïde est dite un organe de « nature oxydative » dans lequel les ERO sont indispensables à l'hormonogénèse thyroïdienne, ainsi, les ERO participent activement à la plupart des étapes de la synthèse hormonale qui sont constituées majoritairement par des réactions oxydatives, telles que, l'oxydation d'ions iodure, l'iodation des résidus tyrosines et le couplage des iodotyrosines (**Karownik et Lewinski 2003**). En plus, le peroxyde d'hydrogène sert d'un cofacteur limitant pour la thyroperoxydase (**Song et al., 2012**). En conséquence, les cellules thyroïdiennes comportent un système enzymatique antioxydant important qui est responsable de la dégradation et du piégeage des radicaux libres en raison de protection contre les dommages oxydatifs imminents (**Bjijrkman et Ekholm 1995**).

Les enzymes anti-oxydantes sont responsables de limiter les effets des molécules oxydantes dans les tissus et de jouer un rôle crucial dans la défense contre les dommages oxydatifs cellulaires étant des piègeurs de radicaux libres (**Gutteridge 1995**). Pour cette raison, on a examiné les activités de plusieurs enzymes indiquant le statut antioxydant cellulaire dans la thyroïde des rates pré-implantées.

En effet, les activités de la CAT, SOD, GPx et la GST ont augmenté d'une manière remarquable dans le tissu thyroïdien des rates gravides intoxiquées par la faible dose du $K_2Cr_2O_7$. Les mêmes résultats sont rapportés du CrVI chez des rats et des poissons (**Patlolla et al., 2009; Kumari et al., 2014**).

Le processus de détoxification des espèces réactives à l'oxygène implique généralement l'activation du SOD qui catalyse la conversion du superoxyde en peroxyde d'hydrogène, ce dernier est soit métabolisé par la CAT en eau et oxygène, soit détoxifié par le GPx pour prévenir les effets délétères des radicaux libres et des métabolites réactifs générés après l'exposition aux substances toxiques (**Fridovich 1986 ; Kim et al., 2016; Messarah et al., 2012**). Par conséquent, les activités accrues de ces enzymes peuvent être liées à leur capacité de maintenir l'homéostasie du potentiel redox cellulaire après l'exposition au $K_2Cr_2O_7$ dans notre étude.

Ainsi, l'induction des activités des enzymes anti-oxydantes peut être une réponse adaptative à la génération excessive des ERO ; qui présente le résultat d'une synthèse de novo et/ ou d'une activation enzymatique, en reflétant un mécanisme protecteur afin d'atténuer les dommages oxydatifs induits par le $K_2Cr_2O_7$ dans les cellules thyroïdiennes des rates gestantes (**Travacio et Llesuy 1996**). Cette augmentation des activités de SOD et de GPx induite par le chrome chez nos rates peut être due à l'élévation des niveaux d'ARN messager pour éliminer les radicaux libres comme celle observée chez le poisson zèbre et les embryons de *Bufo gargarizans* lors d'une exposition au CrVI (**Jin et al., 2015 ; Li et al. (2018)**). En outre, l'étude réalisée par **Travacio et al. (2000)** a révélé que l'administration du CrVI a augmenté les activités enzymatiques anti-oxydantes dans les homogénats cérébraux de souris femelles.

D'autre part, le GST joue un rôle essentiel dans l'initiation de la neutralisation des agents alkylants en catalysant la conjugaison des toxiques avec le groupe SH du glutathion, facilitant ainsi leur élimination (**Dorval et al., 2003**). L'augmentation de l'activité de la GST déterminée dans la présente étude, observée aussi après l'exposition au CrVI dans les branchies des mollusques bivalves *Mytilus galloprovincialis* ainsi que le foie et les branchies des poissons juvéniles *Sebastes schlegelii* (**Ciacci et al., 2012; Kim et Kang 2016**). Sachant que le glutathion est le cofacteur du GPx et du GST, **Topal et al. (2015)** ont rapporté que l'augmentation de la teneur en GSH dans les tissus cérébraux de la truite arc-en-ciel après un traitement au $NiCl_2$ peut être due à la synthèse accrue de ce peptide antioxydant afin de lutter contre la génération des ERO résultantes de l'intoxication par les métaux lourds.

L'exposition de nos rates gestantes au chrome provoque une induction marquée de la fragmentation d'ADN dans la glande thyroïdienne suivie d'une augmentation marquée du score total des dommages d'ADN. En effet, L'interaction des radicaux libres, des aldéhydes dérivés de la peroxydation lipidique et des protéines carbonylées avec l'ADN peut conduire à l'hydrolyse des liaisons chimiques, entraînant une fragmentation de l'ADN (**De Bont et van Larebeke 2004**). Par conséquent, les métaux ont tendance à se lier principalement à l'ADN et aux protéines nucléaires, conduisant ainsi à la détérioration oxydative de ces biomolécules (**Flora et al., 2008**).

En outre, l'ADN est potentiellement sensible aux substrats de la réaction du Fenton. Une induction importante des dommages à l'ADN et des nucléosides oxydés est détectée dans l'ADN nucléaire et mitochondrial de la thyroïde porcine soumise au stress oxydatif (**Stepniak et al., 2013; Karbownik-Lewińska et al., 2012**).

Le CrVI impose sa génotoxicité et sa mutagénicité par des différents mécanismes; il se lie à l'ADN et affecte la stabilité génomique en interagissant avec le processus d'appariement et d'empilement de bases, ce qui permet aux mutations de se produire (**Fang et al., 2014**). Ainsi, des dommages oxydatifs de l'ADN sont observés dans plusieurs tissus après une exposition orale au CrVI chez les souris ainsi que dans les lymphocytes après un traitement *in vitro* (**Sekihashi et al., 2001 ; Blasiak et Kowalik 2000**), ces résultats coïncidaient avec l'effet genotoxique du $K_2Cr_2O_7$ observé à la fois dans les cellules thyroïdiennes et médullaires dans la présente étude. La génotoxicité et la cytotoxicité induite par le CrVI pourraient être liées aussi à sa capacité d'induire des dommages oxydatifs génomiques en générant des ERO et des intermédiaires réactifs du Cr, tels que le CrV et le CrIV pendant sa cascade de réduction cellulaire. Par la suite, ces espèces réactives sont capables d'attaquer l'ADN et les protéines et provoquer des anomalies chromosomiques, qui peuvent éventuellement altérer l'intégrité et les fonctions cellulaires (**Lushchak et al., 2008**).

Les composés du CrVI sont des puissants agents genotoxiques, mutagènes et inducteurs d'aberrations chromosomiques (**Langård et Costa 2007**). En effet, plusieurs mécanismes sont impliqués dans la génotoxicité induite par le CrVI, y compris les dommages à l'ADN, les aberrations chromosomiques et formation de micronoyaux. De plus, le CrVI agit comme un perturbateur de l'expression génique. En outre, la modification génomique causée par l'attachement covalent d'un produit chimique, les liaisons croisées protéines-ADN et ADN-ADN, les sites abasiques et les bases d'ADN oxydées sont impliquées dans la mutagénicité

induite par le CrVI *in vivo* et *in vitro* (Fang *et al.*, 2014 ; Myslak et Kosmider 1997 ; Leroyer *et al.*, 1998). Ainsi, il est suggéré que les liaisons croisées ascorbate- CrIII- ADN et les adduits binaires CrIII- ADN ; générés au cours du métabolisme intracellulaire du CrVI sont principalement impliqués à la fois dans la mutagénicité et la génotoxicité du CrVI (Zhitkovich *et al.*, 2005).

Les dommages de l'ADN accumulés et les aberrations chromosomiques induites par l'exposition aux génotoxines pendant la division mitotique peuvent induire la formation de micronoyaux (Luzhna *et al.* 2013). En se basant sur nos résultats, le K₂Cr₂O₇ a induit la formation des micronoyaux dans les cellules de la moelle osseuse de rates *Albinos Wistar* pré-implantées, ce qui conforte des études précédentes, où il est rapporté que l'exposition au CrVI a augmenté la fréquence des micronoyaux chez les rats et les poissons (Khalil *et al.*, 2013 ; Vasylykiv *et al.*, 2010). De façon similaire, le K₂Cr₂O₇ a induit des micronoyaux chez les souris à partir des cassures et pertes chromosomiques. Ainsi, la formation de micronoyaux induite par le CrVI peut être attribuée à son activité clastogène (Chorvatovičová *et al.*, 1993). De même, les fragments d'ADN résultants de dommages génomiques pourraient former de petits noyaux (Khalil *et al.*, 2013). Ce qui est corroboré par la fragmentation de l'ADN observée dans notre étude. De plus, l'hyperméthylation des gènes de réparation de l'ADN par le CrVI peut opprimer leur expression et éventuellement causer une réparation défectueuse des dommages à l'ADN et conduire à la formation de micronoyaux (Hu *et al.*, 2018, García-Rodríguez *et al.*, 2013).

Le rapport entre le nombre de PCE en mitose et le nombre total de (PCE + NCE) est un indicateur de l'état de prolifération cellulaire. Ainsi, la diminution du rapport PCE à NCE dans le test du micronoyau est un indicateur de la toxicité de la moelle osseuse (Suzuki *et al.*, 1989). Selon nos résultats, l'administration sous-cutanée de la faible dose de K₂Cr₂O₇ a provoqué un effet cytotoxique dans les cellules de la moelle osseuse, ce qui a réduit d'une manière significative le nombre de PCE / 1000 (PCE + NCE). En plus, nos résultats ont coïncidé avec des études antérieures rapportant la cytotoxicité et la mort cellulaire induites par le CrVI dans les cellules HepG2 et les fibroblastes bronchiques humains primaires (Zhong *et al.*, 2017 ; Wise *et al.*, 2002). De plus, le CrVI est capable d'induire l'apoptose via différentes voies, notamment des dommages à l'ADN, une perturbation de la perméabilité de la membrane mitochondriale et une augmentation de l'expression du P53 (Wang et Shi 2001).

En outre, concernant l'induction de la cytotoxicité induite par $K_2Cr_2O_7$ dans la moelle osseuse des nos rates gestantes provoquant une diminution très marquée des erythrocytes polychromatiques comme il a été mentionné précédemment et montré par les résultats de notre étude, le CrVI est capable d'induire un état du stress oxydatif via la surproduction des ERO pendant son cycle redox, par conséquent, les ERO accumulés peuvent exercer notamment une mito-dépression et une cytotoxicité (**Sasaki et al., 2001**).

Des études antérieures ont montré que l'administration de substances anti-oxydantes a atténué la toxicité induite par le CrVI (**Chandra et al., 2007; Goodarzi et al., 2017; Saber et al., 2015**). Ainsi, la co-administration du Se et du $ZnCl_2$ ou les des deux combinés a contrebalancé la perturbation hormonale thyroïdienne induite par la faible dose du $K_2Cr_2O_7$, le stress oxydatif, la fragmentation de l'ADN, les altérations histologiques et la myélotoxicité chez les rates *Albinos Wistar* pré-implantées.

La co-administration du Se, $ZnCl_2$ ou la combinaison simultanée des deux éléments a induit des effets chélatifs efficaces, elle a diminué la bioaccumulation du Cr dans le tissu thyroïdien, en particulier dans le groupe co- traité avec le $ZnCl_2$. Par ailleurs, chez les rats mâles le Zn a réduit la teneur en cadmium dans la glande thyroïdienne (**Hammouda et al., 2008**); cela peut être dû à sa capacité à interagir avec des éléments essentiels et à réduire leur contenu dans les tissus (**Girotti et al., 1985**).

De plus, le Se peut avoir une action détoxifiante contre les ions métalliques en modifiant leur distribution (**Badiello et al., 1996**). En effet, la capacité chelative du Se sert à la formation de complexes inactifs en interagissant avec les métaux redox (**Whanger 1992**).

En ce qui concerne l'hormonogénèse thyroïdienne, le co-traitement avec le $ZnCl_2$ a amélioré d'une manière significative les taux plasmatiques de la TSH, la T3 et la T4; ceci pourrait s'expliquer par l'indispensabilité du Zn, non seulement pour l'activité des enzymes qui transforment la T4 en sa forme active grâce à ses propriétés anti-oxydantes ; mais aussi pour la synthèse de la TSH dans l'adéno-hypophyse et la TRH dans l'hypothalamus (**Brandao-Neto et al., 2006; Danforth et Burger 1989; Pekary et al., 1991**). De plus, le Zn est nécessaire pour que le récepteur de la T3 adopte sa conformation structurale active. Parmi les effets liés à la déplétion du zinc sont dus à la perte du Zn des récepteurs nucléaires, ce qui provoque l'altération de la fonction de la T3 (**Ibrahim et al., 2016**). En outre, l'utilisation

thérapeutique du Zn a amélioré la fonction thyroïdienne chez les patients du syndrome du Down en influençant leur axe hypophysio- thyroïdien (**Napolitano *et al.*, 1990**).

De plus, l'intégrité structurale de la glande thyroïde des rates pré-implantées est remarquablement restaurée dans le groupe co-traité par le ZnCl₂. De même, il est rapporté que l'administration du ZnCl₂ chez les rates gravides ou allaitantes a atténué les lésions histologiques rénales induites par l'arsenic chez leurs progénitures (**Nasiry Zarrin Ghabaee *et al.*, 2017**).

Par ailleurs, il est rapporté que l'apport du Zn seul ou en combinaison avec le Se a amélioré le gain du poids corporel et inversé les changements du poids relatif de la thyroïde chez les rats *Wistar* traités par le cadmium ce qui conforte nos résultats (**Hammouda *et al.*, 2008**).

Le co-traitement des rates gestantes avec le ZnCl₂ a atténué, cet effet antagoniste du Zn peut être attribué à sa capacité protectrice contre la peroxydation du glutathion et des lipides observée dans les cellules cérébrales des souris traités par le nickel (**Šulinskienė *et al.*, 2019**). De même, Il est noté que le Zn peut empêcher l'oxydation des composants de la membrane cellulaire en occupant les sites de liaison cellulaire des pro-oxydants (**Zago et Oteiza 2001**).

D'autre part, la co-administration du ZnCl₂ chez les rates gestantes dans la présente étude a diminué les activités des enzymes anti-oxydantes dans la glande thyroïdienne. Ceci peut être expliqué par le fait que le Zn joue un rôle vital dans la défense cellulaire contre les radicaux libres; puisque c'est un cofacteur du Cu / Zn SOD, un régulateur de l'activité du GPx et un puissant inducteur de l'expression de la métallothionéine (**Cruz *et al.*, 2015; Lima et Sampaio 2011; Oteiza *et al.*, 1996**). En plus, l'efficacité anti-radicalaire du Zn contre le stress oxydatif, l'apoptose et la nécrose induits par un autre métal lourd, le cadmium est rapportée par plusieurs études antérieures (**Jacquillet *et al.*, 2006; Jihen *et al.*, 2010; Rogalska *et al.*, 2009**).

Concernant son effet genoprotecteur, le Zn a montré un impact marqué sur le maintien de l'intégrité de l'ADN en empêchant ses dommages oxydatifs et en régulant des gènes de réparation de l'ADN via des facteurs de transcription en doigts de zinc (**Ho *et al.*, 2003 ; 2004**). Ainsi, le traitement prophylactique au Zn a favorisé la réparation de l'ADN dans les cellules HeLa en empêchant l'inhibition des interactions ADN-protéine exercées par le

cadmium (**Hartmann et Hartwig 1998**). En supportant les résultats obtenus dans la présente étude qui indiquent que le co-traitement avec le $ZnCl_2$ a atténué la fragmentation de l'ADN, la formation de micronoyaux et la cytotoxicité induites par le $K_2Cr_2O_7$ dans les cellules thyroïdiennes et médullaires des rates pré-implantées. Le Zn a montré des effets anti-génotoxiques et anti-cancérogènes *in vivo* et *in vitro* contre les dommages génomiques générés lors de l'exposition aux génotoxines (**Wang et al., 2017**). Pareillement, Il agit comme un agent anti-apoptotique et présente un effet antioxydant et chimio-préventif contre la cytotoxicité et la génotoxicité induites par le Cr (**Sankaramanivel et al., 2010**). Ainsi, ces effets multi-protecteurs étaient efficaces contre les toxicités induites par les métaux lourds (**Kouadria et al., 2019 ; Kostecka-Sochoń et al., 2018 ; Rafique et al., 2010**).

D'une manière analogue, en basant sur les résultats de notre étude, le co-traitement avec le Se a amélioré le statut hormonal et histologique de la glande thyroïdienne des rates pré-implantées. En plus, il a montré des effets antioxydants et gènesprotecteurs. En effet, cette amélioration peut s'expliquer par le fait que le Se est un oligo-élément clé qui participe largement au maintien de l'homéostasie thyroïdienne. Ainsi, une augmentation de la concentration plasmatique en T3 dans le groupe co-traité par le Se pourrait être attribuée à une induction de l'activité des déiodinases I ; et à une augmentation de la conversion de la T4 en T3 (**Thomson et al., 2009**). Par conséquent, les modifications de la quantité d'ARN messager du DIOI dans le foie du rat ont provoqué une altération de l'activité du DIOI et un dysfonctionnement thyroïdien (**Berry et al., 1991**).

De même, lorsque le Se est supplémenté dans le régime alimentaire des rats traités au méthimazole, le taux plasmatique de la T4 est partiellement amélioré, tandis que le taux de la T3 est revenu dans la marge physiologique normale. De plus, le Se a favorisé une récupération partielle du poids corporel des rates allaitantes et leurs progénitures, ce qui concorde avec nos données (**Ben Amara et al., 2009**).

De plus, les résultats de l'étude histologique de la présente étude sont en accord avec ceux de **Hala et al. (2016)** qui ont rapporté que le Se a prévenu les altérations morphologiques induites par le CrVI dans la glande thyroïdienne. En plus, la supplémentation du Se a amélioré les altérations histologiques dans les tissus hépatique et rénale des rats mâles traités par voie orale au cadmium (**El-Heni et al., 2008**).

En outre, le co-traitement avec le Se a induit un effet antagoniste contre les dommages oxydatifs et l'apoptose induits par le $K_2Cr_2O_7$ dans le tissu thyroïdien des rates gestantes. Cette amélioration peut être expliquée par l'action anti-oxydante et anti-péroxydative. de même, il est décrit que le Se a contrebalancé la peroxydation lipidique et la déplétion du glutathion induite par l'acétate de plomb dans la thyroïde des rats mâles (**Atteia et al., 2018**). Pareillement, **Hassanin et al. (2013)** ont mis en évidence les effets antioxydants et anti-apoptotiques du Se contre le stress oxydatif et la fibrose induits par le CrVI, ce qui concorde avec le fait que le Se participe activement dans le système antioxydant. Il peut être considéré comme un piègeur exogène des ERO formées dans la thyroïde après une exposition au CrVI (**Hala et al. 2016**).

Par ailleurs, la co-administration du Se dans la présente étude a amélioré les activités des enzymes anti-oxydantes dans la thyroïde des rates pré-implantées, ce qui peut être liée à son incorporation dans de nombreuses enzymes anti-oxydantes dépendantes du Se dont le glutathion peroxydase, le glutathion réductase et la thiorédoxine réductase lesquelles protègent les thyrocytes contre les dommages oxydatifs (**Winther et al., 2015 ; Flora et al., 2002**). Par conséquent, l'amélioration du piégeage des radicaux libres, l'implication dans la défense anti-oxydante et la chélation des métaux se sont avérés être des contributeurs majeurs à la protection induite par le Se contre les effets toxiques du $K_2Cr_2O_7$ (**Soudani et al., 2010**).

D'autre part, bien que l'effet synergique du Se et du Zn est plus efficace contre le dysfonctionnement thyroïdien et les lésions oxydatives rénales induits par le cadmium chez les rats mâles *Wistar* (**Hammouda et al., 2008 ; Messaoudi et al., 2009**). L'administration combinée du Se et du $ZnCl_2$ dans cette étude a montré moins d'effets thyroprotecteurs chez les rates gestantes exposées par voie sous-cutanée au $K_2Cr_2O_7$ par rapport au co-traitement avec le Se seul ou le $ZnCl_2$ seul. Ainsi, les résultats obtenus n'ont montré aucune amélioration significative des taux plasmatiques de T3 et T4 dans le groupe co-traité simultanément par les deux éléments. En fait, les oligo-éléments essentiels ont la tendance à interagir les uns avec les autres au niveau cellulaire lorsqu'ils sont administrés simultanément ou en combinaison avec des ions métalliques, conduisant ainsi à modifier leur biodisponibilité cellulaire, et exerçant un pouvoir pro-oxydant ou diminuant leurs effets chimio-protecteurs contre la toxicité des métaux (**Bouayed et Bohn 2010**).

En outre, tant que le Se possède un rôle central dans l'hormonogénèse et le métabolisme thyroïdien, l'amélioration insignifiante des taux d'hormones thyroïdiennes observée dans la présente étude peut être due en premier lieu à l'effet du Zn sur la biodisponibilité du Se dans les thyrocytes. En effet, il est rapporté que la co-administration du Zn a aboli l'effet anticarcinogène du Se en empêchant son absorption (**Schrauzer *et al.*, 1976**). En revanche, l'administration combinée du Se et du Zn peut avoir un effet pro-oxydant, qui a probablement affecté l'hormonogénèse thyroïdienne. En effet, des niveaux accrus de H₂O₂ ont inhibé la capture et l'oxydation de l'iodure (**Moreno *et al.*, 2002**). De plus, **Fortunato *et al.* (2010)** ont rapporté que les activités de la thyroperoxydase et de la dual oxydase, deux enzymes clés impliquées dans la synthèse des hormones thyroïdiennes, sont diminuées lors de la production de H₂O₂. De cette manière, plusieurs études ont rapporté que l'interaction entre les antioxydants exogènes peut exercer des effets pro-oxydants à fortes doses ou en présence d'ions métalliques (**Bouayed et Bohn 2010**). De même, l'interaction du Se et du Zn pourrait conduire à une altération de la réparation de l'ADN médiée par des motifs de doigt du Zn (**Yildiz *et al.*, 2019**).



***CONCLUSION &
PERSPECTIVES***

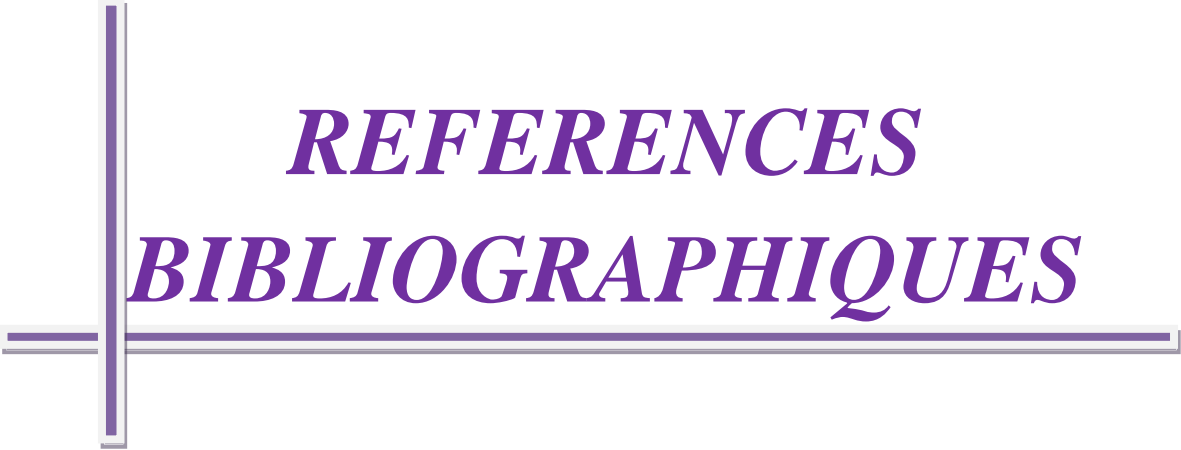
Conclusions et perspectives

Notre travail de recherche a pour objectif de mieux comprendre le mode d'action cytotoxique du chrome hexavalent, un perturbateur endocrinien au niveau de la glande thyroïdienne d'une part et de mettre en évidence d'autre part, l'effet protecteur des oligoéléments, le zinc et le sélénium contre cette toxicité et l'importance des agents antioxydants dans la lutte contre le stress oxydant induit par le chrome hexavalent.

Les résultats obtenus peuvent être résumés dans les points suivants :

- L'administration de trois doses croissantes 10, 50, et 100 mg/ kg. Pc du $K_2Cr_2O_7$ a diminué le poids corporel des rates gestantes. Néanmoins, il a provoqué une augmentation du poids absolu et relatif thyroïdien.
- Les résultats obtenus ont révélé que le $K_2Cr_2O_7$ a induit une hypothyroïdie périphérique caractérisée par une diminution des taux plasmatiques de la T3 et T4 et une augmentation de la TSH. En plus, des altérations histologiques dans la glande thyroïde.
- L'administration de la dose la plus faible 10 mg/ kg. Pc du $K_2Cr_2O_7$ a induit les effets thyrotoxiques les plus prononcés.
- L'administration de 10 mg/ kg. Pc du $K_2Cr_2O_7$ a induit un stress oxydant thyroïdien traduit par l'augmentation de la peroxydation lipidique, la carbonylation protéique et les activités des enzymes anti-oxydantes SOD, CAT, GPx et le GST.
- Le $K_2Cr_2O_7$ a provoqué l'apoptose via la voie de la caspase-3, la fragmentation d'ADN et la formation des micronoyaux dans les rates gestantes *Albinos Wistar*.
- L'administration concomitante du zinc et sélénium chez les rates exposées au chrome hexavalent a significativement amélioré cette perturbation endocrinienne.
- Le zinc et le sélénium ont contrebalancé les effets du chrome sur le profil hormonal thyroïdien et hypophysaire,

- ils ont restauré partiellement l'histoarchitecture et le statut oxydant de la glande ce qui suggère l'effet protecteur de ces oligoéléments contre les dommages oxydatifs induits par le chrome hexavalent.
- Les résultats obtenus de la présente étude ont nous permet de confirmer que l'acquisition ces connaissances sur les effets délétères du chrome hexavalent et les métaux lourds en général peuvent être des enjeux majeurs de la santé publique car même l'exposition à des faibles doses des métaux lourds pourrait avoir des répercussions sur la santé.
- De cet effet, ce travail de thèse peut être complété par des études plus approfondies et comme perspectives on propose de :
 - Examiner les effets perturbateurs des composés du chrome hexavalent sur l'axe thyroïdien chez la gestante sur les descendants pour cerner son impact sur la progéniture.
 - Faire des études mécanistiques pour mettre en évidence l'action du chrome hexavalent sur la fonction des enzymes, transporteurs et récepteurs impliquée dans l'hormonogénèse thyroïdienne.
 - Développer des mesures ciblées visant à limiter l'exposition au chrome hexavalent surtout en milieu professionnel et de prévenir contre ses effets délétères par l'évaluation de l'efficacité des agents protecteurs et antioxydants en testant la combinaison de plusieurs molécules administrées par de différents doses et voies d'administration.
 - Faire une étude analytique qui sert à quantifier les concentrations du chrome hexavalent dans les denrées alimentaires d'origine végétale ou animale.
 - Faire des études *in vivo* et *in vitro* pour évaluer les risques sanitaires liés à l'exposition au chrome hexavalent et ses composés.



REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

A decorative box with a wavy top and bottom edge, containing the letter 'A' in a stylized, calligraphic font.

-**Acharya UR, Mishra M, Tripathy RR, Mishra I(2006)** Testicular dysfunction and antioxidative defense system of Swiss mice after chromic acid exposure. *Reproductive Toxicology* 22 : 87–91.

-**Adeeko A, Li D, Forsyth DS, et al. (2003)** Effects of in utero tributyltin chloride exposure in the rat on pregnancy outcome. *Toxicol Sci* 74(2): 407- 415.

-**Adjadj E, Schlumberger M, de Vathaire F (2009)** Germ-line DNA polymorphisms and susceptibility to differentiated thyroid cancer. *The Lancet Oncology*. Elsevier Ltd, 10 (2): 181–190.

-**Adjroud O (1995)** Peripheral excitatory effects of two enkephalinase inhibitors, acetorphan and thiorphan, and an enkephalin analogue, [d-Ala²-Met⁵]-enkephalinamide, on uterine motility in periparturient rats in vivo and in vitro. *Reprod* 104 (2): 181- 186.

-**Adjroud O (2009)** Effects of potassium dichromate on haematological parametrs in female and male wistar albino rats. *Ass. univ. Bull. environ. Res* 12: 2.

-**Adjroud O (2010)** Protective effects of selenium against potassium dichromate- induced hematotoxicity in female and male Wistar albino rats. *Annales de Toxicologie Analytique* 22: 165- 172.

-**Adjroud O (2013)** The toxic effects of nickel chloride on liver, erythropoiesis, and development in *Wistar* albino preimplanted rats can be reversed with selenium pretreatment. *Environ Toxicol* 28 (5): 290– 298.

-**Ahmad MK, Syma S, Mahmood R (2011)** Cr (VI) Induces Lipid Peroxidation, Protein oxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in human erythrocytes. *Biol Trace Elem Res* 144: 426- 435.

Références bibliographiques

- Alexander J, Aaseth J, Norseth T (1982)** Uptake of chromium by rat liver mitochondria. *Toxicology* 24: 115- 122.
- Al-Samhari MM, Al-Rasheed NM, Al-Rejaie S, et al. (2016)** Possible involvement of the JAK/STAT signaling pathway in N-acetylcysteine-mediated antidepressant-like effects. *Exp Biol Med (Maywood)* 241(5): 509- 518.
- Alpoim MC, Geraldles CF, Oliveira CR, Lima MC. (1995)**. Molecular mechanisms of chromium toxicity: oxidation of hemoglobin. *Biochem Soc Trans* 23: 241- 242.
- Aktac T, Bakar E (2002)** The histopathological changes in the mouse thyroid depending on the aluminium. *Cell Mol Biol* 1:69–72
- Arreola-Mendoza L, Reyes J, Melendez E et al (2006)** Alpha-tocopherol protects against the renal damage caused by potassium dichromate. *Toxicology* 218: 237– 246.
- Association des enseignants d'immunologie ASSIM (2020) Méthodes en immunologie.** Des principes aux bonnes applications en recherche, en industrie. Chapitre 4 : techniques avec traceurs. 2^e édition, Par Monique R.
- Atteia HH, Arafa MH, Prabakar K (2018)** Selenium nanoparticles prevent lead acetate-induced hypothyroidism and oxidative damage of thyroid tissues in male rats through modulation of selenoenzymes and suppression of miR-224. *Biomed Pharmacother* 99: 486– 491.
- Avila-Rojas SH, Tapia E, Briones-Herrera A, et al. (2018)** Curcumin prevents potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$)- induced renal hypoxia, *Food and Chemical Toxicology*. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.09.046>.



Références bibliographiques

- **Bancroft JD, Gamble M (2008)** Theory and Practice of Histological Techniques. 6th Edition, Churchill Livingstone. Elsevier, China.

- **Boas M et al. (2006)** Environmental chemicals and thyroid function. *European Journal of Endocrinology* 154: 599- 611.

- Badiello R, Feroci G, Fini A (1996)** Interaction between trace elements: selenium and cadmium ions. *J TRACE ELEM MED BIO* 10: 156– 162.

- Bagchi D, Bagchi M, Stohs S (2001)** Chromium (VI)-induced oxidative stress, apoptotic cell death and modulation of p53 tumor suppressor gene. *Mol Cell Biochem* 222(1/2): 149- 158.

- Bagchi D,Stohs JS, Downs BW, et al. (2002)** Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium.*Toxicol* 180(1): 5- 22.

- Banu S, Stanley J, Lee J (2011)** Hexavalent chromium-induced apoptosis of granulosa cells involves selective sub-cellular translocation of Bcl-2 members, ERK1/2 and p53. *Toxicol Appl Pharmacol*251(3): 253- 266.

- Banu SK, Samuel JB, Arosh JA et al (2008)** Lactational exposure to hexavalent chromium delays puberty by impairing ovarian development, steroidogenesis and pituitary hormone synthesis in developing Wistar rats. *Toxicol.Appl.Pharmacol* 232: 180–189.

- Barceloux DG (1999)** Chromium. *J Toxicol Clin Toxicol* 37(2): 173- 194.

- Barrera D, Maldonado PD, Medina-Campos O et al (2003)** HO-1 induction attenuates renal damage and oxidative stress induced by K₂Cr₂O₇. *Free Radic. Biol. Med* 34 (11):1390– 1398.

- Beauchamp C and Fridovich I (1971)** Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem* 44: 276–287.

- Ben Amara I et al (2009)** Effect of selenium on hypothyroidism induced by methimazole (MMI) in lactating rats and their pups. *Acta Biol Hung* 61(2):145- 157.

Références bibliographiques

- Ben Hamida F, Soussia L, Guermazi F, Rebai T, Zeghal N (2001)** Effets de deux antithyroïdiens (propylthiouracile et perchlorate) sur la fonction thyroïdienne de la souris en période d'allaitement. *Ann Endocrinol* 62:446- 453.
- Ben Hamida F, Troudi A, Sefi M, et al. (2016).**The protective effect of propylthiouracil against hepatotoxicity induced by chromium in adult mice. *Toxicol Ind Health*32(2): 235- 245.
- Bell SG, Vallee BL (2009)** The metallothionein/thionein system: an oxidoreductive metabolic zinc link. *Chembiochem* 10(1): 55- 62.
- Berry MJ, Banu L, Larsen PR (1991)** Type I iodothyronine deiodinase is a selenocysteine-containing enzyme. *Nature* 349(6308):438–440.
- Betsy A, Binitha MP, Sarita S (2013)** Zinc deficiency associated with hypothyroidism: an overlooked cause of severe alopecia. *Int J Trichology* 5(1): 40- 42.
- Björkman U, Ekholm R (1995)** Hydrogen peroxide degradation and glutathione peroxidase activity in cultures of thyroid cells. *Mol Cell Endocrinol* 111: 99–107.
- Blasiak J, Kowalik J (2000)** A comparison of the in vitro genotoxicity of tri- and hexavalent chromium. *Mutat. Res*469: 135- 145.
- Boas M, Feldt-Rasmussen U, Skakkebak NE, Main KM (2006)** Environmental chemicals and thyroid function. *Eur J Endocrinol* 154: 599–611.
- Bouayed J, Bohn T (2010)** Exogenous antioxidants-double-edged swords in cellular redox state: health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative Med Cell Longev* 3(4): 228- 237.
- Bradford M (1979)** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem* 72: 248–254.

-Brandao-Neto J et al. (2006) Lack of acute zinc effect on thyrotropin releasing hormone–stimulated thyroid-stimulating hormone secretion during oral zinc tolerance test in healthy men. *Nutr Res* 26: 493- 496.

τ

-Chaurasia SS, Gupta P, Kar A, Maiti PK (1996) Free radical mediated membrane perturbation and inhibition of type-I iodothyronine 59- monodeiodinase activity by lead and cadmium in rat liver homogenate. *Biochem Mol Biol Int* 39:765–770.

-Chen D, Ma H, Hong H, et al. (1999) Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science* 284: 2174- 2177.

-Chorvatovičová D, Kováčiková Z, Šandula J, et al. (1993) Protective effect of sulfoethylglucan against hexavalent chromium. *Mutat Res* 302: 207- 211.

-Ciacci C et al (2012) Effects of sublethal, environmentally relevant concentrations of hexavalent chromium in the gills of *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol* 120–121:109–118.

-Clairbone A (1985) Catalase activity. *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. CRC, Press Boca Rton FL, pp 283-284.

-Cohen M, Kargacin B, Klein C et al. (1993) Mechanisms of chromium carcinogenicity and toxicity. *Crit Rev Toxicol* 23: 255– 281.

-Collins AR et al. (1996) Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environ Health Perspect* 104: 465–469.

-Cooke GM, Tryphonas H, Pulido O, et al. (2004) Oral (gavage), in utero and postnatal exposure of Sprague-Dawley rats to low doses of tributyltin chloride. Part 1: Toxicology, histopathology and clinical chemistry. *Food Chem Toxicol* 42(2): 211- 220.

Références bibliographiques

-Corvilain, B. et al.(2000) Stimulation by iodide of H₂O₂ generation in thyroid slices from several species. American journal of physiology. Endocrinology and metabolism, 278 (4) : 692–699.

-Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK, et al. (2004) Best practice guideline: Toxicologic histopathology. Toxicol Pathol 32:126–131.

-Cruz KJ, de Oliveira AR, Marreiro Ddo N (2015) Antioxidant role of zinc in diabetes mellitus. World J Diabetes 6(2): 333- 337.



-Danforth E Jr, Burger AG (1989) The impact of nutrition on thyroid hormone physiology and action. Annu Rev Nutr 9: 201- 227.

-Dai G, Levy O, Carrasco N (1996) Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. Nature 458–460.

-De Bont R, van Larebeke N (2004) Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. Mutagenesis 19(3):169–185.

-De Lima Junior NC, et al. (2021) Subacute exposure to lead promotes disruption in the thyroid gland function in male and female rats. Environ Pollut. 1; 274:115889.

-Debetto P, Luciani S (1988) Toxic effect of chromium on cellular metabolism. Sci Total Environ 1, 71(3): 365- 377.

-Dedieu A, et al.(2010) Revisiting Iodination Sites in Thyroglobulin with an Organ-oriented Shotgun Strategy. doi: 10.1074/jbc.M110.159483.

-**Dohán O et al. (2003)** The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. *Endocr Rev* 24(1): 48- 77.

-**Dorea JG (2002)** Iodine nutrition and breast feeding. *J Trace Elem Med Biol* 16:207–220.

-**Dorval J, Leblond VS, Hontela A (2003)** Oxidative stress and loss of cortisol secretion in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed in vitro to endosulfan, an organochlorine pesticide. *Aquat Toxicol* 63: 229– 241.

-**Du Y, Bales KR, Dodel RC (1997)** Activation of a caspase 3-related cysteine protease is required for glutamate-mediated apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(21): 11657-62.

-**Duntas LH (2020)** Selenium and at-risk pregnancy: challenges and controversies. *Thyroid Res* 13 (16).

£

-**ElBakry RH, Tawfik SM (2014)** Histological study of the effect of potassium dichromate on the thyroid follicular cells of adult male albino rat and the possible protective role of ascorbic acid (vitamin C). *J Microsc Ultrastruct. Environ Monit* 14:2121–2126.

-**El Heni J, Messaoudi I, Hamouda F, Kerkeni A (2008)** Protective effects of selenium (Se) and zinc (Zn) on cadmium (Cd) toxicity in the liver and kidney of the rat: histology and Cd accumulation. *Food Chem Toxicol* 46(11):3522–3527.

-**Elia A, Dörr A, Mastrangelo C, Prearo M, Abete M (2006)** Glutathione and antioxidant enzymes in the hepatopancreas of crayfish *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) of Lake Trasimeno (Italy). *Bulletin Francais de la Pêche ET de la Protection des Milieux Aquatiques*, pp 1351–1361.

-**Elia A, Dörr A, Prearo M, Taticchi M, Abete M (2007)** Detoxification enzymes of freshwater crayfish *Procambarus clarkii* fed a diet enriched in selenium: preliminary results. *Marine Freshwater Physiol Behav* 40:195–199.

-El-Sharaky AS, Newairy AA, Badreldeen MM, Eweda SM, Sheweita SA (2007) Protective role of selenium against renal toxicity induced by cadmium in rats. *Toxicology* 235:185– 193.

-Elshazly MO, Morgan MA, Ali ME, et al. (2016) The mitigative effect of Raphanus sativus oil on chromium- induced geno- and hepatotoxicity in male rats. *J Adv Res*7: 413- 421.



-Fang Z, Zhao M, Zhen H, Chen L, Shi P, Huang Z (2014) Genotoxicity of tri- and hexavalent chromium compounds in vivo and their modes of action on DNA damage in vitro. *PLoS One* 9(8):e103194.

-Favier A (2003) Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Mécanismes biochimiques. L'act Chim* 108- 115.

-Favier A (2006) Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann Biol Clin* 64(6): 390- 396.

-Fernandes MAS, Mota IM, Silva MTL, Oliveira CR, Geraldés CFGC, Alpoim MC (1999). Human erythrocytes are protected against chromate induced peroxidation. *Ecotoxicol Environ Safety* 43: 38- 46.

-Fericola C, Govoni S, Coniglio L, Trabucchi M (1985) Toxicologic hazards at the endocrine level of the heavy metals. *G Ital Med Lav* 7:175–180.

-Flohe L and Gunzler W (1984) Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 105: 114–121.

-Flora SJ, Kannan GM, Pant BP, Jaiswal DK (2002). Combined administration of oxalic acid, succimer and its analogue for the reversal of gallium arsenide induced oxidative stress in rats, *Arch. Toxicol.* 76: 269- 276.

-Flora SJS, Mittal M, Mehta A (2008) Heavy metal induced oxidative stress and its reversal by chelation therapy. *Indian J Med Res* 128: 501–523.

-Formigari A, Irato P, Santon A (2007) Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: biochemical and cytochemical aspects. *Comp Biochem Physiol C*. 146: 443- 459.

-Fortunato RS, Lima de Souza EC, Hassani RAE, et al. (2010) Functional consequences of dual oxidase-thyroperoxidase interaction at the plasma membrane. *J Clin Endocrinol Metab* 95(12): 5403- 5411.

-Forrest D (1996) Deafness and goiter: molecular genetic considerations. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 2764- 2767.

-Fridovich I (1986) Biological effects of the superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* 247(1):1–11.



-Gaide Chevronnay HP, Janssens V, Van der Smissen P, et al. (2015) A mouse model suggests two mechanisms for thyroid alterations in infantile cystinosis: decreased thyroglobulin synthesis due to endoplasmic reticulum stress/unfolded protein response and impaired lysosomal processing. *Endocrinology* 156(6): 2349- 2364.

-García-NiñoWR et al (2013) Curcumin pretreatment prevents potassium dichromate-induced hepatotoxicity, oxidative Stress, decreased respiratory complex I activity, and membrane permeability transition pore opening. *Evid Based Complement Alternat Med*, 424692.

-García-Rodríguez MC, Carvente-Juárez MM, Altamirano-Lozano MA (2013) Antigenotoxic and apoptotic activity of green tea polyphenol extracts on hexavalent chromium induced DNA damage in peripheral blood of CD-1 mice: Analysis with differential Acridine orange/ethidium bromide staining. *Oxid. Med. Cell. Longev*(2), 486419.

Références bibliographiques

- Garait B (2006)** Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin®. These Doctorat. University of Joseph Fourier - Grenoble 1. 198.
- Gaschler MM, Stockwell BR (2017)** Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 482 : 419- 425.
- Gilbert ME, Rovet J, Chen Z, Koibuchi N (2012)** Developmental thyroid hormone disruption: prevalence, environmental contaminants and neurodevelopmental consequences. *Neurotoxicology* 33(4): 842- 852.
- Girotti AW, Thomas JP, Jordan JE (1985)** Inhibitory effect of zinc (II) on free radical lipid peroxidation in erythrocyte membranes. *J. Free Radic. Biol. Med* 1: 395- 401.
- Glass CK, Rosenfeld MG (2000)** The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 14:121- 141.
- Goodarzi Z, Karami E, Ahmadizadeh M (2017)** Simvastatin attenuates chromium-induced nephrotoxicity in rats. *Nephrothol* 6(1):5- 9.
- Grotto D et al. (2009).** Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects FOR malondialdehyde quantification. *Química Nova*32(1): 169- 174.
- Gunaratnam M, Grant MH (2001)** The role of glutathione reductase in the cytotoxicity of chromium (VI) in isolated rat hepatocytes. *Chem Biol Interact* 134(2): 191- 202.
- Guissouma H, Dupré SM, Demeneix BA (2005)** Répression transcriptionnelle du gène *TRH*. *MEDECINE/SCIENCES* 21: 854- 859.
- Gupta P, Chaurasia S, Maiti P, Kar A (1997)** Cadmium induced alterations in extrathyroidal conversion of thyroxine to triiodothyronine by type-I iodothyronine 59-monodeiodinase in male mouse. *Horm Metab Res* 29:151–152.

-Gutteridge JMC (1995) Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem* 41(12): 1819- 1828.



-Hadie SNH, Abdul-Manan H, Abdulla S (2013) Thyroid Gland Resection in euthanised Rat: a Practical Guide. *Internal Medecine Journal* 20 (1): 1- 4.

-Hala ZE, Ibrahim KR, Hemmat HG (2016) A histological study on the possible protective effect of selenium against chromium-induced thyrotoxicity in adult male albino rats. *The Egyptian Journal of Histology* 39(1).

-Hamdy SM, Shaban AM, Aziz YSA, Mahmoud AM, Moemen LAA, Ibrahim WM, Gad NS (2018) Ameliorative role of jania rubens alga against toxicity of heavy metal polluted water in male rats. *Science, Technology & Public Policy* 2(2): 38- 46

-Hammouda F, Messaoudi I, el Hani J, et al. (2008) Reversal of cadmium-induced thyroid dysfunction by selenium, zinc, or their combination in rat. *Biol Trace Elem Res* 126:194- 203.

-Hartmann M, Hartwig A (1998) Disturbance of DNA damage recognition after UV-irradiation by nickel (II) and cadmium (II) in mammalian cells. *Carcinogenesis* 19: 617- 621.

-Hassanin KM, Abd El-Kawi SH, Hashem KS (2013) The prospective protective effect of selenium nanoparticules against chromium-induced oxidative and cellular damage in rat thyroid. *Int J Nanomedicine* 8: 1713- 1720.

-Hayashi MT, Sofuni JR, Ishidate M (1983) An application of Acridine Orange fluorescent Staining to micronucleus test. *Mutat. Res* 120: 241- 247.

-Ho E (2004) Zinc deficiency, DNA damage and cancer risk. *J Nutr Biochem* 15: 572- 578.

-Ho E, Courtemanche C, Ames BN (2003) Zinc deficiency induces oxidative DNA damage and increases P53 expression in human lung fibroblasts. *J Nutr* 133(8): 2543- 2548.

-Hodin RA, Lazar MA, Chin WW (1990) Differential and tissue-specific regulation of the multiple rat c-erbA messenger RNA species by thyroid hormone. *J Clin Invest*85 : 101- 105.

-Holland S, et al. (2007) Application of the comprehensive set of heterozygous yeast deletion mutants to elucidate the molecular basis of cellular chromium toxicity. *Genome Biol* 8(12):R268

-Hu G, Li P, Cui X, et al. (2018) Cr (VI)-induced methylation and down-regulation of DNA repair genes and its association with markers of genetic damage in workers and 16HBE cells. *Environ Pollut*238: 833- 843.

J

-IARC (International Agency for Research on Cancer) (1990) Chromium, nickel and weldings. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* 49: 1- 648.

-Ibrahim SH, Naeem MR, ALshymaa AS (2016) Effect of selenium and zinc supplementation on hypothyroidism in rats. *ARC J Nutri Growth* 2 (2): 16- 27.

-Ito M, Roeder RG (2001) The TRAP/SMCC/Mediator complex and thyroid hormone receptor function. *Trends Endocrinol Metab* 12(3): 127- 134.

J

- Jennings R, Premanandan C (2017) Veterinary histology, chapter 15 endocrine system, thyroid gland. The Ohio state university.

-Jacquillet G et al (2006) Zinc protects renal function during cadmium intoxication in the rat. *Am J Physiol Ren Physiol* 290: 127- 137.

Références bibliographiques

-Jahnabi S, Choudhuri S, Choudhuri D (2017) Effect of subchronic exposure to chromium on hematological and biochemical parameters of male albino rat. *Asian J Pharm Clin Res* 10(5):345–348.

-Jarup L (2003) Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin* 68(1):167-182.

-Jihen H et al (2010) Cadmium retention increase: a probable key mechanism of the protective effect of zinc on cadmium-induced toxicity in the kidney. *Toxicol Lett* 196(2): 104–109.

-Jin Y, Liu Z, Liu F, Ye Y, Peng T, Fu Z (2015) Embryonic exposure to cadmium (II) and chromium (VI) induce behavioral alterations, oxidative stress and immunotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicol Teratol* 48: 9- 17.

- Johns LE, Ferguson KK, Cantonwine DE, Mukherjee B, Meeker JD, McElrath TF (2018) Subclinical changes in maternal thyroid function parameters in pregnancy and fetal growth. *J Clin Endocrinol Metab* 103(4):1349–1358

-Jones I, Srinivas M, Ng L, Forrest D (2003) The thyroid hormone receptor beta gene: structure and functions in the brain and sensory systems. *Thyroid*13: 1057- 1068.



-Käkelä R, Käkelä A, Hyvärinen H (1999) Effects of nickel chloride on reproduction of the rat and possible antagonistic role of selenium. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 123: 27– 37.

-Karbownik M, Lewinski A (2003) The role of oxidative stress in physiological and pathological processes in the thyroid gland; possible involvement in pineal-thyroid interactions. *Neuro Endocrinol Lett* 24(5): 293- 303.

-Karbownik-Lewińska M et al (2012) High level of oxidized nucleosides in thyroid mitochondrial DNA; damaging effects of Fenton reaction substrates. *Thyroid Res* 5: 24.

- Karbownik-Lewińska M, Kokoszko-Bilska A (2012)** Oxidative damage to macromolecules in the thyroid - experimental evidence. *Thyroid Res* 5: 25.
- Khalaf AA, Hassanen EI, Ibrahim MA, et al. (2020)** Rosmarinic acid attenuates chromium-induced hepatic and renal oxidative damage and DNA damage in rats. *J Biochem Mol Toxicol* 11-12
- Khalaf AH, Arafat EA (2015)** Effect of different doses of monosodium glutamate on the thyroid follicular cells of adult male albino rats: a histological study. *Int J Clin Exp Pathol* 8 (12): 15498- 15510.
- Khalil S, Awad A, Elewa Y (2013)** Antidotal impact of extra virgin olive oil against genotoxicity, cytotoxicity and immunotoxicity induced by hexavalent chromium in rat. *Int. J. Vet. Sci. Med* 1: 65- 73.
- Kim JH, Kang JC (2016)** Oxidative stress, neurotoxicity, and metallothionein (MT) gene expression in juvenile rock fish *Sebastes schlegelii* under the different levels of dietary chromium (Cr⁶⁺) exposure. *Ecotox Environ Safe* 125: 78–84.
- Köhrle J et al. (2005)** Selenium, the thyroid, and the endocrine system. *Endocr. Rev* 26: 944-984.
- Koller KJ, Wolff RS, Warden MK, Zoeller RT (1987)** Thyroid hormones regulate levels of thyrotropin-releasing-hormone mRNA in the paraventricular nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:7329- 7333.
- Kopp P (2000)** Pendred's Syndrome and Genetic Defects in Thyroid Hormone Synthesis. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*. Kluwer Academic Publishers, 1.
- Kostecka-Sochoń P, Onopiuk BM and Dąbrowska E (2018)** Protective effect of increased zinc supply against oxidative damage of sublingual gland in chronic exposure to cadmium: experimental study on rats. *Oxid. Med. Cell. Longev* 373284.

Références bibliographiques

-Kotyzova D, Hodkova A, Bludovska M et al (2015) Effect of chromium (VI) exposure on antioxidant defense status and trace element homeostasis in acute experiment in rat. *Toxicol Ind Health* 31(11): 1044-1050.

-Kouadria M, Djemli S and Tahraoui A (2019) The protective effect of zinc and magnesium against subchronic cadmium toxicity in wistar rats (biochemical and neurobehavioral effects). *Asian J Pharm Clin Res* 12(5): 217- 225.

-Krim M, Messaadia A, Maida I et al (2013) Protective effect of ginger against toxicity induced by chromate in rats. *Ann Biol Clin (Paris)* 71(2): 165– 173.

-Kubrak OI et al. (2010) Chromium effects on free radical processes in gold fish tissues: comparison of Cr (III) and Cr (VI) exposures on oxidative stress markers, glutathione status and antioxidant enzymes. *Comp Biochem Phys C* 152(3):360–370.

-Kumari K, Khare A, Dange S (2014) The applicability of oxidative stress biomarkers in assessing chromium induced toxicity in the fish *Labeo rohita*. *Biomed Res Int* 2014:782493.

I

-Langård S and Costa M (2007) Chapter 24-Chromium. In *Handbook on the Toxicology of Metals*. 3rd ed, pp. 487- 510.

-Larsen PR, Zavacki AM (2012) The role of the iodothyronine deiodinases in the physiology and pathophysiology of thyroid hormone action. *Eur Thyroid J* 1(4): 232- 242.

-Lauwerys RR (1999) Chrome. *Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles*, Masson Eds, pp. 188-198.

-Lazar MA (1993) Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocr Rev* 14(2):184-93. doi: 10.1210/edrv-14-2-184.

-Leclère J, et al. (2001) *La thyroïde : des concepts à la pratique clinique*, 2ème édition, Editions Elsevier. pp 617.

- Léonard A, Lauwerys R (1980)** Carcinogenicity and mutagenicity of chromium. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* 76(3): 227- 239.
- Leroyer C, Dewitte JD, Bassanets A, et al. (1998)** Occupational asthma due to chromium. genetics to epigenetics and beyond. *Front Genet*4: 131.
- Leung AM, Braverman LE (2014)** Consequences of excess iodine. *Nat Rev Endocrinol* 10(3): 136- 142.
- Lezoualc'h F et al. (1992)** 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*6: 1797- 1804.
- Li H, Ganta S, Fong P (2010)** Altered ion transport by thyroid epithelia from CFTR^{-/-} pigs suggests mechanisms for hypothyroidism in cystic fibrosis. *Experimental Physiology* 95(12) : 1132-1144.
- Li Y, Zhao Y, Deng H, Chen A, Chai L (2018)** Endocrine disruption, oxidative stress and lipometabolic disturbance of *Bufo gargarizans* embryos exposed to hexavalent chromium. *Ecotoxicol Environ Saf* 166: 242- 250.
- Li ZH, Chen L, Wu YH, Li P, Li YF, Ni ZH (2014)** Effects of waterborne cadmium on thyroid hormone levels and related gene expression in Chinese rare minnow larvae. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol* 161:53- 57.
- Lima VBS, Sampaio FA (2011)** Parameters of glycemic control and their relationship with zinc concentrations in blood and with superoxide dismutase enzyme activity in type 2 diabetes patients. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 55: 701- 707.
- Losi ME, Amrhein C, Frankenberger WT (1994)** Environmental biochemistry of chromium. *Rev Environ Contam Toxicol* 136 : 91-121.

- **Lushchak OV, Kubrak OI, Nykorak MZ, Storey KB, Lushchak VI (2008)** The effect of potassium dichromate on free radical processes in goldfish: possible protective role of glutathione. *Aquat Toxicol.* 28, 87(2):108- 114.

-**Luzhna L, Kathiria P, Kovalchuk O (2013)** Micronuclei in genotoxicity assessment: from radical processes in goldfish: possible protective role of glutathione. *Aquat Toxicol Respiration*65: 403- 405.



- **Ma Y, Zhang Y, Xiao Y, Xiao F (2020)** Increased Mitochondrial Fragmentation Mediated by Dynamin-Related Protein 1 Contributes to Hexavalent Chromium-Induced Mitochondrial Respiratory Chain Complex I-Dependent Cytotoxicity. *Toxics.* 29, 8(3): 50.

- **Mahmoud AM, Abd El-Twab SM (2017)** Caffeic acid phenethyl ester protects the brain against hexavalent chromium toxicity by enhancing endogenous antioxidants and modulating the JAK/STAT signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 91: 303-311.

-**Mahmood T, Qureshi IZ, Iqba MJ (2010)** Histopathological and biochemical changes in rat thyroid following acute exposure to hexavalent chromium. *Histol Histopathol* 25(11):1355–1370.

-**Mahmood T, Qureshi IZ, Nadeem MS et al. (2008)** Hexavalent chromium toxicity in pituitary and thyroid glands. *Pakistan Journal of Zoology* 40(2): 91- 97.

-**Maret W (2000)** The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox state. *J Nutr* 130(5S Suppl):1455S-8S.

-**Marouani N, Tebourbi O, Mahjoub S, Yacoubi MT, Sakly M, Benkhalifa M, Rhouma KB (2012)** Effects of hexavalent chromium on reproductive functions of male adult rats. *Reprod Biol* 12(2): 119- 133.

- Mary Momo CM, Ferdinand N, Omer Bebe N, et al. (2019)** Oxidative effects of potassium dichromate on biochemical, hematological characteristics, and hormonal levels in rabbit doe (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet Sci* 6(1): 30.
- Mattagajasingh SN, Misra BR, Misra HP (2008)** Carcinogenic chromium (VI)-induced protein oxidation and lipid peroxidation: implications in DNA–protein crosslinking. *J. Appl. Toxicol* 28: 987- 997.
- McNabb A (1992)** Control of thyroid gland function. In *Thyroid Hormones*. New Jersey: Prentice Hall. 49- 73.
- Mercier Y, Gatellier P, Renerre M (2004)** Lipid and protein oxidation in vivo, and antioxidant potential in meat from Charolais cows finished on pasture or mixed die. *Meat Sci* 66: 467– 473.
- Messaoudi I, El Heni J, Hammouda F et al (2009)** Protective effects of selenium, zinc, or their combination on cadmium-induced oxidative stress in rat kidney. *Biol Trace Elem Res* 130:152–161.
- Messarah M, Klabet F, Boumendjel A et al (2012)** Hepatoprotective role and antioxidant capacity of selenium on arsenic- induced liver injury in rats. *Exp. Toxicol. Pathol* 64:167- 174.
- Miller MD, Crofton KM, Rice DC, Zoeller RT (2009)** Thyroid-disrupting chemicals: interpreting upstream biomarkers of adverse outcomes. *Environ Health Perspect* 117(7):1033– 1041
- Mishra S, Bharagava RN (2016)** Toxic and genotoxic effects of hexavalent chromium in environment and its bioremediation strategies. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 34(1): 1- 32.
- Mitchell AL, Pearce SHS (2019)** Autoimmune thyroid diseases. In: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Schroeder HW, Frew AJ, Weyand CM (eds) *Clinical immunology, principles and practice*, 5th ed. Elsevier, Philadelphia, pp 947- 956.

Références bibliographiques

-Moreno JC, Bikker H, Kempers MJ, et al. (2002) Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism. *N Engl J Med* 347: 95- 102.

-Myslak M, Kosmider K (1997) Kinetics of cell division in peripheral blood lymphocytes of stainless steel welders. *Med. Pr*48: 261- 264.



-Napolitano G, Palka G, Lio S, et al. (1990) Is zinc deficiency a cause of subclinical hypothyroidism in Down syndrome? *Ann Genet* 33(1): 9- 15.

-Nasiry Zarrin Ghabaee D et al. (2017) Administration of zinc against arsenic-induced nephrotoxicity during gestation and lactation in rat model. *J Nephropathol* 6(2): 74- 80.

- Nishikawa S (1983) Effects of sulfonamides on the pituitary-thyroid gland: 1. Morphological changes of thyroid gland and variation in plasma thyroxine and triiodothyronine. *J Toxicol sci* 8: 47-59.

-Nudler S, Quinteros F, Miler EA, et al.(2009) Chromium VI administration induces oxidative stress in hypothalamus and anterior pituitary gland from male rats. *Toxicol Lett* (185):187–92.



-O'Brien TJ, Ceryak S, Patierno SR (2003) Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms. *Mutat Res* 533: 3–36

-Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351- 358.

-Ono H, Osamu W, Ono T (1982) Distribution of trace metals in nuclei and nucleoli of normal and regenerating rat liver with special reference to the different behavior of nickel and chromium. *J Toxicol Environ Health* 8: 947- 957.

-Oteiza PL, Olin KL, Fraga CG, Keen CL (1996) Oxidant defense systems in testes from zinc deficient rats. *Exp Biol Med* 213: 85- 91.

-Oze C, Bird D, Fendorf S (2007) Genesis of hexavalent chromium from natural sources in soils and groundwater. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 104: 6544- 6549.

P

-Paksy K, Varga B, Lázár P (1996) Zinc protection against cadmium- induced infertility in female rats. Effect of zinc and cadmium on the progesterone production of cultured granulosa cells. *BioMetals* 10: 27– 36.

-Patel JG, Joshi DV, Patel BJ et al (2017) Pathology of experimentally induced acute toxicity of potassium dichromate in Wistar rats (*Rattus norvegicus*). *Indian J. Vet. Pathol* 41(1): 75- 77.

-Patlolla AK, Barnes C, Yedjou C, Velma VR, Tchounwou PB (2009) Oxidative stress, DNA damage, and antioxidant enzyme activity induced by hexavalent chromium in Sprague-Dawley rats. *Environ Toxicol* 24(1): 66–73.

-Pedraza-Chaverri J, Barrera D, Medina-Campos ON et al.(2005) Time course study of oxidative and nitrosative stress and antioxidant enzymes in $K_2Cr_2O_7$ -induced nephrotoxicity. *BMC Nephrol* 6: 4.

-Pedraza-Chaverri J, Yam-Canul P, Chirino YI et al. (2008) Protective effects of garlic powder against potassium dichromate-induced oxidative stress and nephrotoxicity. *Food Chem Toxicol* 46(2): 619- 627.

Références bibliographiques

- Pekary AE, Lukaski HC, Mena I, Hershman JM (1991)** Processing of TRH precursor peptides in rat brain and pituitary is zinc dependent. *Peptides* 12: 1025- 1032.
- Petit A, Mwale F, Tkaczyk C, et al. (2005)** Induction of protein oxidation by cobalt and chromium ions in human U937 macrophages. *Biomaterials* 26(21): 4416- 4422.
- Petit A, Mwale F, Tkaczyk C, et al. (2006)** Cobalt and chromium ions induce nitration of proteins in human U937 macrophages in vitro. *J Biomed Mater Res A* 79(3): 599- 605.
- Picada JN, Flores DG, Zettler CG et al. (2003)** DNA damage in brain cells of mice treated with an oxidized form of apomorphine. *Mol. Brain Res* 114: 80- 85.
- Pilat-Marcinkiewicz B et al (2003)** Structure and function of thyroid follicular cells in female rats chronically exposed to cadmium. *Bulletin-Veterinary Institute in Pulawy* 47:157–163.
- Pirahanchi Y, Toro F, Jialal I (2020)** Physiology, Thyroid Stimulating Hormone. In: Stat Pearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499850/>.
- Poli G, Biasi F, Leonarduzzi G (2008)** 4-hydroxynonenal—protein adducts: a reliable biomarker of lipid oxidation in liver diseases. *Mol Asp Med* 29: 67- 71.
- Poreba M, Strozyk A, Salvesen GS, Drag M (2013)** Caspase Substrates and Inhibitors. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5: a008680.
- Portulano C, Paroder-Belenitsky M, Carrasco N (2014)** The Na⁺/I⁻ Symporter (NIS): mechanism and medical impact. *Endocrine Reviews* 35 (1): 106- 149.
- Prashanth L, Kattapagari KK, Chitturi RT, Baddam VR, Prasad LK (2015)** A review on role of essential trace elements in health and disease. *J NTR Univ Health Sci* 4:75- 85.

Références bibliographiques

-Prakash P et al (1997) Superoxide anion radical production as a cadmium-mediated mechanism of toxicity in avian thyroid: An electron spin resonance study by spin trapping. *Comp Biochem Physiol Part C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 118:89–95.

-Proctor D, Otani J, Finley B, et al. (2002) Is hexavalent chromium carcinogenic via ingestion, A weight-of-evidence review. *J.Toxicol.Environ.Health.A* 65: 701-746.

Q

-Quinteros F, Poliandri A, Machiavelli L, Cabilla JP, Duvilanski BH (2007) In vivo and in vitro effects of chromium VI on anterior pituitary hormone release and cell viability. *Toxicol Appl Pharmacol* 218(1):79–87.

R

-Rafique M, Shaikh SP and Tahir F (2010) Protective effect of zinc over lead toxicity on testes. *J Coll Physicians Surg Pak* 20 (6): 377- 381.

-Rana SVS (2014) Perspectives in Endocrine Toxicity of Heavy Metals- A Review. *Biol Trace Elem Res* 160: 1-14.

-Ray RR (2016) Adverse hematological effects of hexavalent chromium: an overview. *Interdiscip Toxicol* 9(2): 55- 65.

-Rayman M (2000) L'importance du sélénium pour la santé humaine. *The Lancet* 356: 233-241.

-Rayman MP (2012) Selenium and human health. *Lancet* 379: 1256- 1268.

Références bibliographiques

-Renu K et al. (2021). Molecular mechanism of heavy metals (Lead, Chromium, Arsenic, Mercury, Nickel and Cadmium) - induced hepatotoxicity - A review. *Chemosphere* 271 : 129735.

-Richelmi P, Baldi C (1984) Blood levels of hexavalent chromium in rats. "In vitro" and "in vivo" experiments. *Int J Environ Anal Chem* 17(3- 4):181–186.

-Ris-Stalpers C (2006) Physiology and pathophysiology of the DUOXes. *Antioxid Redox Signal* 8 : 1563–1572.

-Rogalska J, Brzóska MM, Roszczenko A, Moniuszko-Jakoniuk J (2009) Enhanced zinc consumption prevents cadmium-induced alterations in lipid metabolism in male rats. *Chem Biol Interact* 177:142- 152.

-Roman M, Jitaru P, Barbante C (2014) Selenium biochemistry and its role for human health. *Metallomics* 6(1): 25- 54.

-Rosenfeld MG, Glass CK (2001) Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors. *J Biol Chem* 276: 36865- 36868.

-Roy G, Sarma BK, Phadnis PP, et al. (2005) Selenium-containing enzymes in mammals: Chemical perspectives. *J Chem Sci* 117: 287–303.



-Saber TM, Farag MR, Cooper RG (2015) Ameliorative effect of extra virgin olive oil on hexavalent chromium induced nephrotoxicity and genotoxicity in rats. *Revue de Médecine Vétérinaire* 166 (1-2): 11-19.

-Saber-Lichtenberg Y, et al.(2000) Covalent cross-linking of secreted bovine thyroglobulin by transglutaminase. *Faseb J* 14 : 1005–1014.

Références bibliographiques

-Sankaramanivel S, Rajaram A and Rajaram R (2010) Zinc protects human peripheral blood lymphocytes from Cr (III) (phenanthroline)₃-induced apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 243(3): 405- 419.

-Santon A et al. (2006) Effect of Zn treatment on wild type and MT-null cell lines in relation to apoptotic and/or necrotic processes and on MT isoform gene expression. *Biochim. Biophys. Acta* 1763: 305- 312.

-Sasaki N, Baba N, Matsuo M (2001) Cytotoxicity of reactive oxygen species and related agents toward undifferentiated and differentiated rat pheochromocytoma PC12 cells. *Biol. Pharm. Bull* 24: 515- 519.

-Schrauzer GN, White DA, Schneider CJ (1976) Inhibition of the genesis of spontaneous mammary tumors in C₃H mice: effects of selenium and of selenium-antagonistic elements and their possible role in human breast cancer. *Bioinorganic Chemistry* 6(3): 265- 270.

-Sekihashi K, Sasaki T, Yamamoto A, Kawamura K, Ikka T, Tsuda S, Sasaki YF (2001) A comparison of intraperitoneal and oral gavage administration in comet assay in mouse eight organs. *Mutat Res-Gen Tox En* 493(1-2):39–54.

-Shupnik MA, Chin WW, Habener JF, Ridgway EC (1985) Transcriptional regulation of the thyrotropin subunit genes by thyroid hormone. *J Biol Chem* 260: 2900- 2903.

-Singh J, Carlisle DL, Pritchard DE, Patierno SR (1998) Chromium- induced genotoxicity and apoptosis: relationship to chromium carcinogenesis (review). *Oncol Rep* 5(6): 1307- 1318.

-Sole J et al (1990) In vivo effects of nickel and cadmium in rats on lipid peroxidation and ceruloplasmin activity. *Bull Environ Contam Toxicol* 44: 686- 691.

Références bibliographiques

- Song, Y, Driessens N, Costa M, et al. (2007)** Roles of hydrogen peroxide in thyroid physiology and disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 92: 3764- 3773.
- Song M, Kim YJ, Park YK, Ryu JC (2012)** Changes in thyroid peroxidase activity in response to various chemicals. *J Environ Monit* 14(8):2121–2126
- Soudani N, Ben Amara I, Sefi M, et al. (2011)** Effects of selenium on chromium (VI)-induced hepatotoxicity in adult rats. *Exp Toxicol Pathol* 63 (6): 541- 548.
- Soudani N, Sefi M, Ben Amara I et al. (2010)** Protective effects of Selenium (Se) on Chromium (VI) induced nephrotoxicity in adult rats. *Ecotoxicol. Environ. Saf* 73 (4): 671- 678.
- Spears JW, Engle TE (2016)** Feed Ingredients: Feed Supplements: Microminerals. *Encyclopedia of Dairy Sciences* 378- 438.
- Stadtman ER, Levine RL (2006)** Protein Oxidation. *Ann N Y Acad Sci* 899(1): 191–208.
- Stanley JA, Sivakumar KK, Nithy TK et al. (2013)** Postnatal exposure to chromium through mother's milk accelerates follicular atresia in F1 offspring through increased oxidative stress and depletion of antioxidant enzymes. *Free Radic. Biol. Med* 61: 179– 196.
- Stepniak J et al (2013)** Membrane lipids and nuclear DNA are differently susceptible to Fenton reaction substrates in porcine thyroid. *Toxicol in Vitro* 27:71–78.
- Stohs SJ, Bagchi D (1995)** Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* 18: 321- 336.
- Stohs SJ, Bagchi D, Hassoun E, Bagchi M (2000)** Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 19(3): 201- 213. *Crit Rev Toxicol* 36(2): 155- 163.
- Song M, Kim YJ, Park YK, Ryu JC (2012)** Changes in thyroid peroxidase activity in response to various chemicals. *J Environ Monit* 14(8):2121–2126

Références bibliographiques

-**Stuart Ira F** (2011) Human physiology. 12th ed. The McGraw-Hill Companies, Inc. NY. USA.

-**Šulinskienė J et al. (2019)** Effect of zinc on the oxidative stress biomarkers in the brain of nickel-treated mice. *Oxidative Med Cell Longev*.

-**Suljević D, Sulejmanović J, Fočak M, et al. (2020)** Assessing hexavalent chromium tissue-specific accumulation patterns and induced physiological responses to probe chromium toxicity in *Coturnix japonica* quail. *Chemosphere*. 266:129005.

-**Sumner ER, Shanmuganathan A, Sideri TC, Willetts SA, Houghton JE, Avery SV (2005)** Oxidative protein damage causes chromium toxicity in yeast. *Microbiology* 151: 1939- 1948.

-**Suzuki Y, Nagae Y, Li J, et al. (1989)** The micronucleus test and erythropoiesis. Effects of erythropoietin and a mutagen on the ratio of polychromatic to normochromatic erythrocytes (P/N ratio). *Mutagenesis* 420- 424.

-**Suzuki YJ, Carini M, Butterfield A (2010)** Protein carbonylation. *Antioxidants & redox signaling* 12(3).

-**Sverre L, Max C (2015)** Chapter 33-Chromium. *Handbook on the Toxicology of Metals* (Fourth Edition) (2): 717- 742.

- **Steinbrenner H, Sies H (2009)** Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. *Biochim Biophys Acta*. 1790: 1478- 1485.

J

Références bibliographiques

- **Tortora GJ, Derrickson B (2006)** Principles of anatomy and physiology. John Wiley & Sons, Inc. Biological Sciences Textbooks. Bruxelles, Belgique, pp 678- 685.

- Tapiero H, Townsend DM, Tew KD (2003)**The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomedicine & Pharmacotherapy*57: 134- 144.

- Tarasub N, Tarasub C, Ayutthaya WDN (2008)**. Effects of Quercetin on Acute Toxicity of Rat Spleen and Chromosome Aberrations in Bone Marrow Induced by Hexavalent Chromium. *Thammasat Med J* 8(3): 306- 316.

- Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK, Sutton DJ (2012)** Heavy Metals Toxicity and the Environment. *EXS*. 101: 133- 164.

- Thomson CD, Campbell JM, Miller J, Skeaff SA, Livingstone V (2009)** Selenium and iodine supplementation: effect on thyroid function of older New Zealanders. *Am J Clin Nutr* 90:1038- 1046.

- Tice RR, Agurell E, Anderson D et al. (2000)**. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mut* 35: 206- 221.

- Topal A, Atamanalp M, Oruç E, et al. (2015)** Neurotoxic effects of nickel chloride in the rainbow trout brain: Assessment of c-Fos activity, antioxidant responses, acetylcholinesterase activity, and histopathological changes. *Fish Physiol Biochem* 41(3): 625- 634.

- Travacio M, Llesuy S (1996)** Antioxidant enzymes and their modification under oxidative stress conditions. *J. Br. Assoc. Adv. Sci* 48: 9– 13.

- Travacio M, Polo JM, Llesuy S (2000)** Chromium (VI) induces oxidative stress in the mouse brain. *Toxicology* 150 (1-3): 137- 146.

- Twyman RM (2005)** Sample dissolution for elemental analysis / wet digestion. *Encyclopedia of Analytical Science*. 2nd Edition. Elsevier Ltd 146- 153.

V

-**Valko M, Morris H, Cronin MTD (2005)** Metals, toxicity and oxidative stress. Current medicinal chemistry 12: 1161–1208.

-**Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, et al. (2006)** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico-Biological Interactions, 6 (10): 1- 40.

-**Vasylykiv O, Kubrak O, Storey K, et al. (2010)** Cytotoxicity of chromium ions may be connected with induction of oxidative stress. Chemosphere80: 1044- 1049.

-**Voitkun V (1998)** Cr(III)- mediated crosslinks of glutathione or amino acids to the DNA phosphate backbone are mutagenic in human cells. Nucleic Acids Res 26(8): 2024- 2030.

-**Vom Saal FS, Akingbemi BT, Belcher SM, et al. (2007)**Chapel Hill Bisphenol A Expert Panel Consensus Statement: integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. Reprod Toxicol 24: 131- 138.

-**Vyacheslav M, et al. (2014)** Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles. Physiol Rev94: 739- 777.

W

-**Wang S, Shi X (2001)** Molecular mechanisms of metal toxicity and Carcinogenesis. Mol Cell Biochem 222: 3- 9.

-**Wang X, Anl Y, Jiao W et al. (2018)** Selenium protects against lead- induced apoptosis via endoplasmic reticulum stress in chicken kidneys. Biol Trace Elem Res 182: 354– 363.

-**Wang Y, Su H, Gu Y, et al (2017)** Carcinogenicity of chromium and chemoprevention: a brief update. Onco Targets Ther10: 4065- 4079.

Références bibliographiques

-Wedeen RP, Qian LF (1991) Chromium- induced kidney disease. *Environ Health Perspect* 92: 71- 74.

-Wen G, Ringseis R, Eder K (2017) Endoplasmic reticulum stress inhibits expression of genes involved in thyroid hormone synthesis and their key transcriptional regulators in FRTL-5 thyrocytes. *PLoS ONE* 12 (11).

-Weiss SJ, Philp NJ, Grollman EF (1984) Iodide transport in a continuous line of cultured cells from rat thyroid. *Endocrinology* 114 (4): 1090–1098.

-Whanger PD. (1992). Selenium in the treatment of heavy metal poisoning and chemical carcinogenesis. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis.* 16(4): 209- 221.

-Winczura A, Zdzalik D, Tudek (2012) Damage of DNA and proteins by major lipid peroxidation products in genome stability *Free Radic Res* 46(4): 442- 459.

-Winterbourn CC, Hampton MB (2008) Thiol chemistry and specificity in redox signalling. *Free Radic Biol Med* 45(5): 549- 561.

-Winther KH, Bonnema SJ, Cold F, Debrabant B, Nybo M, Cold S, Hegedüs L (2015) Does selenium supplementation affect thyroid function? Results from a randomized, controlled, double-blinded trial in a Danish population. *Eur J Endocrinol* 172: 657- 667.

-Williams G (2000) Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor beta isoforms. *Mol Cell Biol* 20: 8329- 8342.

-Wilbur S, Abadin H, Fay M, Yu D, Tencza B, Ingerman L, Klotzbach J, James S (2012) Toxicological Profile for Chromium. Atlanta (GA): Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US). PMID: 24049864

-Wise JP Sr, Wise SS, Little JE (2002) The cytotoxicity and genotoxicity of particulate and soluble hexavalent chromium in human lung cells. *Mutat Res* 517 (1- 2): 221- 229.

- **Xue W, Wang Z, Chen Q, Chen J, Yang H, Xue S (2010)** High selenium status in individuals exposed to arsenic through coal-burning in Shaanxi (PR of China) modulates antioxidant enzymes, heme oxygenase-1 and DNA damage. Clin Chim Acta. 411:1312–1318.

Y

-**Yen P (2001)** Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. Physiol Rev81: 1097-1142.

-**Young B, et al. (2006)** Wheater's functional histology: a text and colour atlas. 5th edn. Philadelphia, Churchill livingstone.

- **Young B, et al. (2015)** Atlas d'histologie fonctionnelle de Wheater (Français) Broché – 25 .De boeck universite; 6^e édition, pp 316.

-**Yang H, Zhang W, Kong Q, et al. (2013)** Effects of pubertal exposure to thiazole-Zn on thyroid function and development in female rats. Food Chem Toxicol 53:100- 104

-**Yildiz A, Kaya Y, Tanriverdi O (2019)** Effect of the interaction between selenium and zinc on DNA repair in association with cancer prevention. J Cancer Prev 24(3):146–154.

-**Yoshizuka M, et al. (1991)** Cadmium toxicity in the thyroid gland of pregnant rats. Exp Mol Pathol 55:97–104.

Z

-Zago MP, Oteiza PI (2001). The antioxidant properties of zinc: interactions with iron and antioxidants. *Free Radic Biol Med* 31: 266- 274.

-Zhang DW, Shao J, Lin J, Zhang N, Lu BJ, Lin SC, Dong MQ, Han J (2009) RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science* 325 (5938): 332- 336.

-Zhitkovich A (2011) Chromium in drinking water: sources, metabolism and cancer risks. *Chem.Res.Toxicol* 24: 1617- 1629.

-Zhitkovich A, Voitkun V, Costa M (1996) Formation of the Amino Acid–DNA Complexes by Hexavalent and Trivalent Chromium *in Vitro*: Importance of Trivalent Chromium and the Phosphate. *Group Biochemistry (Mosc)* 35(22):7275- 7282.

-Zhong X, de Cássia da Silveira e Sá R, Zhong C (2017) Mitochondrial biogenesis in response to chromium (VI) toxicity in human liver cells. *Int. J. Mol. Sci* 14: 18(9): 1877.

-Zwolak I, Zaporowska H (2012) Selenium interactions and toxicity: a review. *Selenium interactions and toxicity. Cell Biol Toxicol.* 28(1): 31- 46.



Protective effects of selenium and zinc against potassium dichromate–induced thyroid disruption, oxidative stress, and DNA damage in pregnant Wistar rats

Anfal Fedala¹ · Ounassa Adjroud¹ · Salwa Abid-Essefi² · Rim Timoumi²

Received: 14 August 2020 / Accepted: 28 December 2020

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH, DE part of Springer Nature 2021

Abstract

Hexavalent chromium (CrVI) is an environmental pollutant and an endocrine-disrupting metal. Se and Zn are essential trace elements, known to play a crucial role in thyroid homeostasis. However, there is a lack of data reporting thyrotoxicity during gestation. In this study, we investigated the protective effects of selenium and zinc against potassium dichromate–induced thyrotoxicity in pregnant Wistar rats. Thirty pregnant Wistar rats were divided into control and four treated groups receiving subcutaneously (s.c) on the 3rd day of pregnancy, $K_2Cr_2O_7$ (10 mg/kg, s.c) alone, or in association with Se (0.3 mg/kg, s.c), $ZnCl_2$ (20 mg/kg, s.c), or both of them simultaneously. The hormonal profile, oxidative stress biomarkers, DNA damage, and histological modifications were evaluated. Our main findings showed that $K_2Cr_2O_7$ promoted hypothyroidism, oxidative stress, genotoxicity, and histological alterations in the thyroid gland. The co-treatment with Se or $ZnCl_2$ has mitigated $K_2Cr_2O_7$ -induced thyrotoxicity in pregnant Wistar rats by exhibiting antioxidant and genoprotective effects. However, the combined co-treatment of both of them was less thyroprotective, and therefore, further investigations on the synergetic interaction of Se and Zn against CrVI toxicity using different doses and exposure routes are required.

Keywords Hexavalent chromium · Zinc · Selenium · Pregnant rat · Thyrotoxicity · Oxidative stress · Genotoxicity

Introduction

The thyroid gland is known to be prone to endocrine toxins due to its complex histological structure and function (Ben Amara et al. 2009; Ben Hamida et al. 2001; Buha et al. 2013; Rodrigues-Pereira et al. 2015). These toxins can affect the gland homeostasis at many levels, including iodine uptake, thyroid hormone biosynthesis, conversion, metabolism, and degradation; also, they can interrupt hormone-receptor

binding and modulate hormonal actions in the target tissues (Gilbert et al. 2012; Miller et al. 2009).

One of the alleged thyroid-disrupting metals is hexavalent chromium (CrVI); it is widespread in the environment, either naturally or by its excessive usage in anthropogenic activities and improper disposal of industrial wastes (Cohen et al. 1993; Richelmi and Baldi 1984). The amounts of CrVI that have been dispersed through water, soil, and air continue to increase in the last decades, promoting its bioaccumulation in living beings through contaminated food and water (IARC 1990). CrVI-induced toxicity is linked to its oxidizing potency; it generates reactive oxygen species (ROS) and Cr intermediates via its cellular reduction, which interact with biomolecules and cause their oxidative damage (Valko et al. 2006). Although it is generally recognized that cells comprise many antioxidant enzymes, such as catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), and glutathione-S-transferase (GST) that are responsible for neutralizing free radicals and restoring cellular redox homeostasis, the oxidative damage occurs to membrane lipids, proteins, and nucleic acids if ROS are overproduced and the detoxification processes are overwhelmed (Flora 2009). Therefore, several studies reported that CrVI induced

Responsible editor: Mohamed M. Abdel-Daim

✉ Anfal Fedala
a.fedala@univ-batna2.dz

¹ Laboratory of Cellular and Molecular
Physiotoxicology-Biomolecules, Faculty of Science of Nature and
Life, Department of Biology of Organisms, University of Batna 2,
Fesdis, 5000 Batna, Algeria

² Laboratory for Research on Biologically Compatible Compounds,
Faculty of Dental Medicine, Rue Avicenne, 5019 Monastir, Tunisia

cytotoxicity and mutagenicity (Levis and Bianchi 1982). Evenly, CrVI compounds are known to be hematotoxic (Adjroud 2010), hepatotoxic (Soudani et al. 2011), nephrotoxic (Goodarzi et al. 2017), reprotoxic (Jahnabi et al. 2017), and genotoxic (Khorsandi and Rabbani-Chadegani 2013; Monteiro et al. 2019).

Trace elements, namely selenium (Se) and zinc (Zn), are essential for thyroid hormone synthesis and activation (Betsy et al. 2013; Triggiani et al. 2009). Se is mainly incorporated in selenoproteins (Kryukov et al. 2003), which play a definite role in the endocrine system; they are implicated in several physiological processes and biochemical pathways, for instance, spermatogenesis, thyroid hormone deiodination, regulating the genomic transcription, and protecting the cell from ROS by peroxide degradation (Dumitrescu et al. 2005). Regarding the chemopreventive mechanisms of Se, it has been shown that Se prevented free radical formation and diminished lipid peroxidation to overcome CrVI-induced renal injury (Soudani et al. 2010). Additionally, the reduction of DNA-adduct formation and chromosome breaks is considered to be among Se-induced anticarcinogenic effects (Yildiz et al. 2019).

Zn is a potent antioxidant; it is required for many biological functions such as reproduction, fetal development, immunity, growth, and DNA synthesis (Barceloux 1999; Prasad 2013). Also, Zn is known for playing an integral role in the hormonogenesis of thyroid-hypophysis-hypothalamus axis (Brandao-Neto et al. 2006; Farooqi et al. 2000; Pekary et al. 1991). In addition to its well-known functions in several cellular processes, Zn acts as an effective antiradical and anti-inflammatory agent; it inhibits NADPH oxidases, boosts SOD activity, and promotes ROS scavenging by causing the induction of cysteine-rich metallothionein protein expression to keep the cell redox homeostasis (Prasad et al. 2004). Furthermore, Zn yielded antagonistic effects on tumorigenesis by regulating many DNA repair genes via Zn-finger transcription factors (Yildiz et al. 2019).

Although the imperative role of thyroid functions during gestation in animals and humans, there is a lack of studies reporting the oxidative, genotoxic, and endocrine disruptive effects of environmental pollutants in the thyroid gland. Herein, we aimed through this study to investigate the potential protective effects of both Se and Zn against the hazardous effects of potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) on thyroid hormonogenesis, redox status, and DNA integrity in pregnant Wistar albino rats.

Materials and methods

Materials

$K_2Cr_2O_7$, Se, and $ZnCl_2$ were purchased from Sigma-Aldrich (Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany). All chemicals were dissolved in sterile saline (NaCl 0.9%) and the pH was

adjusted when necessary to 7.5. Low melting point agarose and normal melting point agarose were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). 1-Butanol and pyridine were from BDH-ProLabo (Fontenay-sous-Bois, France). Thiobarbituric acid (TBA), trichloroacetic acid (TCA), Tris-HCl, glacial acetic acid, sodium dodecyl sulfate, phosphate-buffered saline (PBS), hydrogen peroxide solution, glutathione reduced, 5, 5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene (CDNB), 2, 4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), and ethidium bromide were supplied by Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). DMSO (Sharlau, Barcelona, Spain), EDTA and ethyl acetate (Thermo Fisher Scientific, Strasbourg, France). BSA solution, nitro blue tetrazolium (NBT), riboflavin, methionine, guanidine hydrochloride, NaOH, Triton X-100, formalin, paraffin, ethanol, xylene, eosin, and hematoxylin (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) were used.

Animals

This study was carried out on healthy female Wistar albino rats purchased from Pasteur Institute, Algiers, Algeria, weighing 180–250 g. All animals were maintained in polypropylene cages, under controlled conditions of light/dark (12/12 h) and temperature (23 ± 1 °C) and had free access to food and water. Female rats were caged with males overnight and those with a positive mating smear were considered to be at day zero of gestation. The standards established by the Institutional Animal Care and Use Committee at Batna University were followed.

Methods

Experimental design

Thirty pregnant Wistar albino rats were used and allocated into five groups of six animals each; they were housed separately from day zero of pregnancy. All rats in different groups were injected on day 3 of pregnancy by subcutaneous route. Each animal was anesthetized with diethyl ether.

The control group received a single injection (s.c) of saline solution 0.9%.

The 2nd group was treated with a single dose of 10 mg/kg, s.c, bw of $K_2Cr_2O_7$; this dose was selected based on the results of our previous studies (Adjroud 2009, 2010).

The remaining groups 3rd, 4th, and 5th were co-treated respectively by $K_2Cr_2O_7$ and Se (0.3 mg/kg, s.c. bw) or with $ZnCl_2$ (20 mg/kg, s.c. bw) or with the three of them simultaneously. The selected dose of Se has antagonized the reprotoxic effects of nickel in male and female rats and their progeny (Käkelä et al. 1999). In addition, it counterbalanced nickel chloride-induced toxic effects in preimplanted Wistar rats (Adjroud 2013). Also, the dose of $ZnCl_2$ was chosen

based on its protective efficacy on heavy metal-induced toxic effects (Paksy et al. 1996; Nasiry Zarrin Ghabaee et al. 2017). On the 20th day of gestation, rats were anesthetized with diethyl ether and blood samples were collected into heparinized tubes from the jugular vein for hormonal quantification. Thyroid glands were quickly excised after the sacrifice (Hadie et al. 2013), rinsed in ice-cold physiological saline solution, and conserved either at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ to assess thyroid oxidative stress markers and DNA damage, or in 10% neutral buffered formalin for the histological examination.

Evaluation of organ and maternal body weight

The maternal body weight of rats was measured on the 3rd and 20th day of gestation, while the thyroid weight was recorded directly after the sacrifice.

$$\text{Relative organ weight (\%)} = \frac{\text{Absolute organ weight}}{\text{Final body weight}} \times 100$$

Hormone quantification

At the 20th day of pregnancy, blood was collected in heparinized tubes and centrifuged at $1500\times g$ for 15 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Plasma samples were drawn and kept at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until hormone analysis. Total plasma concentrations of triiodothyronine (T3), thyroxine (T4), and thyroid-stimulating hormone (TSH) were measured using Roche Cobas E411 analyzer and electrochemiluminescent immunoassay (ECLIA) commercial kits (Elecsys® and Cobas E411 analyzers, Roche Diagnostics, Germany), according to the manufacturer's instructions.

Preparation of thyroid protein homogenates

Thyroid samples were homogenized with a potter (glass-Teflon) in 500 μl of cold Tris-HCl (10 mM, pH 7.4). After, they were centrifuged (12000 rpm, 30 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), the supernatants were recovered and aliquoted in Eppendorf tubes and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until the analysis of stress oxidative biomarkers.

Estimation of protein concentrations in thyroid extracts

Protein concentrations were measured according to the Bio-Rad Protein Assay. To 5 μl of each extract, 95 μl of water and 900 μl of Bradford solution were added, the mixture was allowed to stand at dark for 10 min, and absorbances were read using Biochrom (LIBRA) spectrophotometer (Serlabo technologies, Vedène, France) at 595 nm, where a BSA solution was used as a standard (Bradford 1979).

Superoxide dismutase activity

The measurement of SOD activity is based on a photoreduction method using the NBT. The appearance of the blue color indicates the reduction of NBT by the superoxide anion generated by the riboflavin and methionine mixture in an aerobic environment under the white light. To 50 μl of each thyroid extract, 950 μl of phosphate buffer (pH 7.0), 1 ml of EDTA-methionine (pH 7.8), 85.2 μl of NBT (1 mM), and 22.6 μl of riboflavin (1 mM) were added; the reaction mixture was allowed to stand under white light for 30 min in an ambient temperature. Then, it was read at 540 nm. In addition, two control tubes were prepared; the same reagents were introduced except thyroid extract supernatants which were replaced by the phosphate buffer. The first was incubated under white light and served to SOD total activity, while the second was incubated in the dark in order to set the spectrophotometer at zero. Activity refers to the enzyme amount that inhibits the NBT oxidation by 50%, which is equivalent to one unit of SOD. Results were expressed in IU/mg of protein (Beauchamp and Fridovich 1971).

Estimation of lipid peroxidation status (malondialdehyde assay)

The lipid peroxidation level was determined according to the method of Ohkawa et al. (1979), which is based on the colorimetric reaction between TBA and malondialdehyde resulting in the formation of a colored complex (MDA-TBA₂) which will be assessed spectrophotometrically. To 250 μl of each thyroid extract, 100 μl of 8.1% sodium dodecyl sulfate, 750 μl of both acetic acid (20%) and TBA (0.8%), and 2 ml of water were added, the mixture was heated at $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 2 h, then cooled for 10 min in an ice bath. Finally, 2.5 ml of butanol pyridine (15: 1) was added to the mixture. After centrifugation at 4000 rpm for 10 min, the organic layer was recovered and the optical density was read at 540 nm against the control.

Estimation of catalase activity

Our method was based on monitoring the degradation of hydrogen peroxide by catalase action in a quartz spectrophotometer cuvette containing 780 μl of phosphate buffer solution (pH 7.0), 20 μl of each thyroid extract, and 200 μl of H₂O₂ (1 M). Then, catalase activity was measured at 240 nm for 1 min against an appropriate blank, where the sample was replaced by the phosphate buffer. CAT activity was expressed as millimole of degraded H₂O₂/min/mg of proteins (Clairbone 1985).

Protein carbonyl assay

Proteins and amino acids are targets of oxidation and fragmentation by the ROS attack. Our method consists of the measurement of the reactivity of carbonyl groups by the DNPH. The initial reaction mixture that contains 200 μ l of each thyroid extract and 800 μ l of DNPH was incubated in the dark at room temperature for 1 h. Then, we performed a series of washes. First, we added 1 ml of 20% TCA. The tubes were allowed to stand 10 min in an ice bath. Then, they were centrifuged at 4000 rpm for 5 min in order to prevent the denaturation of proteins. The second wash was done by adding 1 ml of 10% TCA, and then it was vortexed in order to break the protein precipitate. Finally, the pellets were washed for the third time with 800 μ l of ethanol-ethyl acetate (1:1, v/v) to remove any residue of free DNPH. The final precipitates were solubilized in 500 μ l of guanidine hydrochloride (6 M) and left for 10 min at 37 °C. Then, they were centrifuged at 11000 rpm for 10 min. The optical density was read at 340 nm (Mercier et al. 2004).

Glutathione peroxidase assay

Cytosolic glutathione peroxidase activity was assayed following the method of Flohe and Gunzler (1984). Five milliliters of reaction mixture contained 200 μ l of each thyroid extract, 400 μ l of reduced glutathione (GSH; 0.1 mM), and 200 μ l of phosphate buffer (pH 7.8). After an incubation for 5 min at 25 °C, 200 μ l of H₂O₂ (1.3 mM) and 1 ml of 1% TCA were added and the tubes were allowed to set in ice bath for 30 min. Then, they were centrifuged at 3000 rpm/10 min/4 °C in order to recover the supernatants. Finally, 2.2 ml of Na₂HPO₄ (0.32 M, pH 7.4) and 320 μ l of DTNB (0.1 M) were added to 480 μ l of each supernatant and the absorbances were read at 412 nm for an interval of 5 min against controls, which contain all the same compounds except the samples. GPx activity was expressed in μ mol of oxidized GSH/min/mg of protein.

Glutathione-S-transferase assay

GST activity was assayed based on the method described by Elia et al. (2006, 2007). In a spectrophotometer cuvette, 830 μ l of phosphate buffer (100 mM, pH 7.0), 50 μ l of CDNB (20 mM), 100 μ l of GSH (100 mM), and 20 μ l of thyroid extract were mixed using a vortex. The reaction between the reduced glutathione and the CDNB produced a chromophore (1-glutathione-2, 4-dinitrobenzene from 1-Cl-2, 4-dinitrobenzene) which was read by the spectrophotometer at 340 nm for 1 min against a proper blank.

Single-cell gel electrophoresis (comet assay)

The assay is based on the migration of denatured DNA fragments subjected to an electric field. The alteration of DNA integrity depends on the length of the comet tail.

The cell suspension of each thyroid gland was prepared by homogenizing the sample with a potter (glass-Teflon) in PBS solution (pH 7.4); containing DMSO (1%) and EDTA (20 mM). The final cell-agarose suspension was obtained by adding 60 μ l of 0.5% low melting agar to 60 μ l of each cell suspension. A total of 120 μ l of the final cell-agarose suspension was spread over on a 1% normal-melting agar pre-coated microscope slide. The cell lysis was processed by submerging the slides for 24 h at 4 °C in a buffer containing 2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, Tris (10 mM, pH 10.0) with freshly prepared 1% Triton X-100 and 10% DMSO. Then, the slides were washed with deionized water and placed in a horizontal electrophoresis unit (Bio-Rad, California, USA) for 20 min in an alkaline solution containing 300 mM NaOH and 1 mM EDTA (pH > 13.0). Thus, allowing the DNA to unfold. The DNA was electrophoresed for 15 min at 300 mA and 25 V (0.9 V/cm). The slides were neutralized with Tris (0.4 M, pH 7.5). Comets were visualized after staining with ethidium bromide (20 μ g/ml) with Nikon Eclipse TE 300 fluorescence microscope (Nikon, Tokyo, Japan). 100 comets on each slide were scored visually. Based on the fluorescence intensity in the tail, the comets are classified into five classes; each comet class was given a value of 0, 1, 2, 3, and 4 from undamaged, 0, to highly damaged, 4, as described by Collins et al. (1996). The total score was calculated by the following equation (percentage of cells in class 0 \times 0) + (percentage of cells in class 1 \times 1) + (percentage of cells in class 2 \times 2) + (percentage of cells in class 3 \times 3) + (percentage of cells in class 4 \times 4) and it ranged for 100 comets from 0 to 400 (Singh et al. 1988).

Histopathological examination

Thyroid tissues were fixed previously in 10% neutral buffered formalin and processed for histological procedures. The pieces were dehydrated in graded ethanol baths, cleaned in xylene, and embedded in paraffin. Five-micrometer-thick paraffin wax sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and examined using a light microscope from ZEISS Axioscope, Göttingen, Germany (Bancroft and Gamble 2008).

Statistical analysis

All data were expressed as mean \pm SEM ($n = 6$). The statistical comparisons were carried out by using one-way analysis of variance (ANOVA) and followed by Tukey's post hoc test. The statistical analysis was performed using GraphPad Prism 7. The differences were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Effects of Se and ZnCl₂ on maternal body weight, absolute and relative thyroid weights in K₂Cr₂O₇-treated Wistar albino pregnant rats

During the experiment, no mortality was recorded among pregnant Wistar albino rats in any group. Results in Table 1 showed that K₂Cr₂O₇ decreased significantly ($p < 0.001$) the maternal body weight and increased the absolute and relative weights of thyroid glands when compared with the control group. The three co-treatments increased significantly the maternal body weight on the 3rd and 20th day of gestation, whereas the simultaneous administration of Se and ZnCl₂ decreased significantly ($p < 0.001$) the thyroid relative weight when compared with the K₂Cr₂O₇-treated group.

Effects of Se and ZnCl₂ on TSH level and thyroid hormonal profile of K₂Cr₂O₇-treated Wistar albino pregnant rats

The administration of K₂Cr₂O₇ (10 mg/kg, s.c) induced a significant difference of T3 (nmol/L), T4 (nmol/L), and TSH (mIU/L) levels at the 20th day of pregnancy when compared with the control group.

The obtained results showed that K₂Cr₂O₇ decreased the T3 plasma level significantly ($- 48.3 \%$, $p < 0.001$) when compared with the control group (Fig. 1a).

The plasma T4 level was decreased significantly ($- 29.4 \%$, $p < 0.001$) when compared with the control group (Fig. 1b).

Conversely to the decrease of thyroid hormones levels, the level of plasma TSH was increased significantly ($+ 1187.5 \%$, $p < 0.001$) on the 20th day of gestation (Fig. 1c).

The co-administration of K₂Cr₂O₇ and Se induced at the 20th day of pregnancy an insignificant increase in plasma T3 level compared with the K₂Cr₂O₇-treated group (Fig. 1a), whereas plasma T4 level was increased significantly ($+ 26.5 \%$, $p < 0.01$) at the 20th day of pregnancy (Fig. 1b).

On the other hand, the co-treatment with Se has significantly decreased the level of plasma TSH ($- 24.2 \%$, $p < 0.001$) on day 20 of gestation (Fig. 1c).

In addition, the combined administration of ZnCl₂ with K₂Cr₂O₇ prevented the hypothyroidism induced by K₂Cr₂O₇-exposure, the plasma T3 level increased significantly ($+ 47.1 \%$, $p < 0.01$) when compared with the K₂Cr₂O₇-treated group (Fig. 1a).

Furthermore, the plasma T4 level was also increased in a significant way ($+ 29.9 \%$, $p < 0.01$) (Fig. 1b). Additionally, TSH plasma level decreased significantly ($- 25.2 \%$, $p < 0.001$) at the 20th day of gestation when compared with the K₂Cr₂O₇-treated group (Fig. 1c).

The simultaneous administration of Se and ZnCl₂ decreased the TSH plasma level significantly ($- 17.4 \%$, $p < 0.05$) when compared with the K₂Cr₂O₇-treated group (Fig. 1c). On the other hand, the combination of Se and ZnCl₂ did not improve significantly the decreased T3 and T4 plasma levels induced by K₂Cr₂O₇, even though the two elements play an essential role in thyroid hormone synthesis. The concentrations of T3 and T4 increased but the differences stayed insignificant when compared with the K₂Cr₂O₇-treated group (Fig. 1a, b).

Effects of Se and ZnCl₂ on SOD activity in the thyroid of K₂Cr₂O₇-treated Wistar albino pregnant rats

SOD is one of the most important enzymes involved in the antioxidant defense of biological organisms; it catalyzes the dismutation of the superoxide radical into hydrogen peroxide and molecular oxygen to protect the organism against the oxidative action of free radicals. Results indicate that the subcutaneous administration of K₂Cr₂O₇ in pregnant rats caused a significant increase in SOD activity in the thyroid gland as compared with the control group ($p < 0.001$). The co-treatment of K₂Cr₂O₇ with ZnCl₂ or with Se and ZnCl₂ concomitantly induced a significant decrease in the enzyme activity ($p < 0.001$). However, the co-administration of K₂Cr₂O₇ with Se decreased the activity of SOD insignificantly (Table 3).

Table 1 Effects of Se and ZnCl₂ administration on maternal body weight, absolute and relative thyroid weight in K₂Cr₂O₇-treated Wistar pregnant rats. Values are mean \pm SEM ($n = 6$). ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$:

Parameters and treatments	Control	K ₂ Cr ₂ O ₇	K ₂ Cr ₂ O ₇ + Se	K ₂ Cr ₂ O ₇ +ZnCl ₂	K ₂ Cr ₂ O ₇ + Se + ZnCl ₂
Initial body weight (g)	241.5 \pm 8.318	183.83 \pm 3.79***	219 \pm 11.02 ⁺	222.5 \pm 12.902 ⁺	233.167 \pm 10.49 ⁺⁺
Final body weight (g)	299.5 \pm 7.469	222.5 \pm 2.23***	270 \pm 10.56 ⁺⁺	270.167 \pm 5.7 ⁺⁺⁺	271.33 \pm 13.13 ⁺⁺
Absolute thyroid weight (g)	0.128 \pm 0.010	0.169 \pm 0.007**	0.159 \pm 0.008	0.178 \pm 0.003	0.149 \pm 0.005
Relative thyroid weight (g/ 100 g bw)	0.043 \pm 0.004	0.076 \pm 0.004***	0.066 \pm 0.001	0.066 \pm 0.001	0.055 \pm 0.002 ⁺⁺⁺

significant when compared with the control group, ⁺ $p < 0.05$; ⁺⁺ $p < 0.01$; ⁺⁺⁺ $p < 0.001$: significant when compared with the K₂Cr₂O₇ group

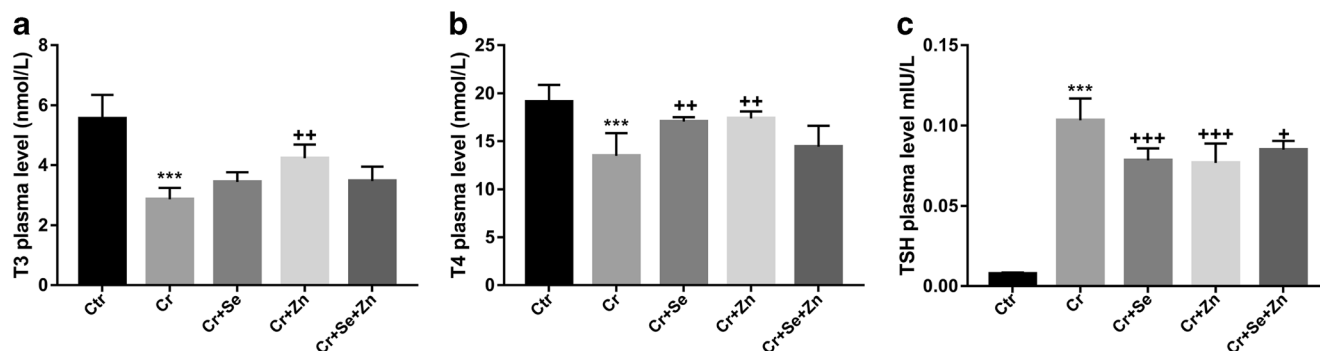


Fig. 1 Effects of Se and ZnCl₂ on plasma T3 (a), T4 (b), and TSH levels in K₂Cr₂O₇-treated Wistar albino pregnant rats. Values are expressed as mean ± SEM, (n = 6). p < 0.05 considered statistically significant, (*)

statistically significant compared with the control. (+) statistically significant compared with the K₂Cr₂O₇ treated group

Effects of Se and ZnCl₂ on lipid peroxidation level in the thyroid of K₂Cr₂O₇-treated Wistar albino pregnant rats

MDA is generated by the oxidative degradation of membrane lipids, which is an indicator of cell death. Results indicate that K₂Cr₂O₇ increased significantly the level of MDA in the thyroid as compared with the control group (p < 0.001). The three co-treatments reduced significantly (p < 0.001) the MDA levels in the thyroid of pregnant rats as shown in Table 2.

groups in the thyroid of pregnant Wistar rats (p < 0.01). However, the formation of carbonyl groups in the thyroid was reduced when K₂Cr₂O₇ was co-administered with Se (p < 0.01) or ZnCl₂ (p < 0.001) or with both of them simultaneously (p < 0.05).

Effects of Se and ZnCl₂ on CAT activity in the thyroid of K₂Cr₂O₇-treated Wistar albino pregnant rats

CAT is one of the enzymes that play a major role in the antioxidant cell defense system; it catalyzes the dismutation of H₂O₂ to protect the cell against oxidative stress. Results in Table 3 show that K₂Cr₂O₇ increased the activity of CAT in the thyroid of pregnant rats compared with the control group (p < 0.001). The co-treatment of K₂Cr₂O₇ with Se, ZnCl₂, or simultaneously with both of them decreased markedly the CAT activity (p < 0.001).

Effects of Se and ZnCl₂ on GPx activity in the thyroid of K₂Cr₂O₇-treated Wistar albino pregnant rats

GPx participates effectively in the cellular antioxidant defense and involves in maintaining redox homeostasis. Results indicate that K₂Cr₂O₇ is able to increase GPx activity in the thyroid of pregnant rats compared with the control group (p < 0.001). However, GPx activity showed a significant decrease in the three co-treated groups with Se (p < 0.001), ZnCl₂ (p < 0.01) or simultaneously with both of them (p < 0.001) (Table 3).

Effects of Se and ZnCl₂ on protein carbonyl level in the thyroid of K₂Cr₂O₇-treated Wistar albino pregnant rats

The obtained results in Table 2 show that K₂Cr₂O₇ induced protein oxidation by increasing the formation of carbonyl

Effects of Se and ZnCl₂ on GST activity in the thyroid of K₂Cr₂O₇-treated Wistar albino pregnant rats

GST is a key enzyme that plays a crucial role in initiating the neutralization of alkylating agents. K₂Cr₂O₇ treatment caused a significant increase in GST activity in thyroid of pregnant Wistar rats, when compared with the control group (p < 0.001). The co-treatment of K₂Cr₂O₇ with Se or ZnCl₂ or concomitantly with both of them showed a significant decrease of GST activity as compared with K₂Cr₂O₇-treated group (p < 0.001) (Table 3).

Table 2 Effects of Se and ZnCl₂ administration on thyroid oxidative stress biomarkers in K₂Cr₂O₇-treated Wistar pregnant rats. Values are mean ± SEM (n = 6). *p < 0.01; **p < 0.001: significant when

compared with the control group, +p < 0.05; ++p < 0.01; +++p < 0.001: significant when compared with K₂Cr₂O₇ group

Oxidative stress biomarkers	Control	K ₂ Cr ₂ O ₇	K ₂ Cr ₂ O ₇ + Se	K ₂ Cr ₂ O ₇ + ZnCl ₂	K ₂ Cr ₂ O ₇ + Se + ZnCl ₂
MDA (µmmol MDA/mg protein)	2137.54±30.87	13417.93±803.9***	7127.87±155.08+++	2530.013±57.17+++	2711.85±27.92+++
PC (µmmol/mg of proteins)	0.011±0.0006	0.015±0.0006**	0.012±0.001++	0.011±0.0001+++	0.012±0.0003+

Table 3 Effects of Se and ZnCl₂ administration on thyroid antioxidant enzymes activities in K₂Cr₂O₇-treated Wistar pregnant rats. Values are mean ± SEM (n = 6). *p < 0.01; **p < 0.001: significant when compared

with the control group, +p < 0.05; ++p < 0.01; +++p < 0.001: significant when compared with the K₂Cr₂O₇ group

Antioxidant enzymes activities	Control	K ₂ Cr ₂ O ₇	K ₂ Cr ₂ O ₇ + Se	K ₂ Cr ₂ O ₇ + ZnCl ₂	K ₂ Cr ₂ O ₇ + Se + ZnCl ₂
CAT activity (μmol/min/mg of protein)	230,523 ± 4.197	556,688 ± 11.18***	204,119 ± 4.289+++	163,107 ± 14.508+++	273,632 ± 10.851+++
SOD activity (μmol/min/mg of protein)	1,317 ± 0.041	2,489 ± 0.081***	2.290 ± 0.07 ^{ns}	1.467 ± 0.102+++	1.893 ± 0.06+++
GPx activity (μmol/min/mg of protein)	18,192 ± 0.504	36,227 ± 1.926***	27,931 ± 1.029+++	29,474 ± 0.839++	27,434 ± 0.633+++
GST activity (μmol/min/mg of protein)	0.046 ± 0.00008	0.18 ± 0.003***	0.09 ± 0.002+++	0.065 ± 0.005+++	0.086 ± 0.0007+++

Effects of Se and ZnCl₂ on DNA fragmentation in the thyroid of K₂Cr₂O₇-treated Wistar albino pregnant rats

The alkaline comet assay is widely used to test the genotoxicity of chemicals; results of the total scoring of DNA damage are illustrated in Fig. 2. Results showed that K₂Cr₂O₇ induced significant DNA damage compared with the control group (p < 0.001); it increased from 62.167 ± 0.749 to 311 ± 8.008. The three co-administrations, Cr + Se (p < 0.01), Cr + Zn (p < 0.001), and Cr + Se + Zn (p < 0.05), have reduced significantly the DNA fragmentation compared with the K₂Cr₂O₇-treated group (311 ± 8.008 vs. 277.33 ± 5.457 or 210.833 ± 8.4 or 282.833 ± 5.474, respectively).

Effects of Se and ZnCl₂ on thyroid histoarchitecture in K₂Cr₂O₇-treated Wistar albino pregnant rats

In order to evaluate the histological changes caused by K₂Cr₂O₇ exposure and the potential protective effects of Se and ZnCl₂ in restoring the thyroid gland histoarchitecture, we used H&E staining. The microscopic analysis of thyroid slices from the control

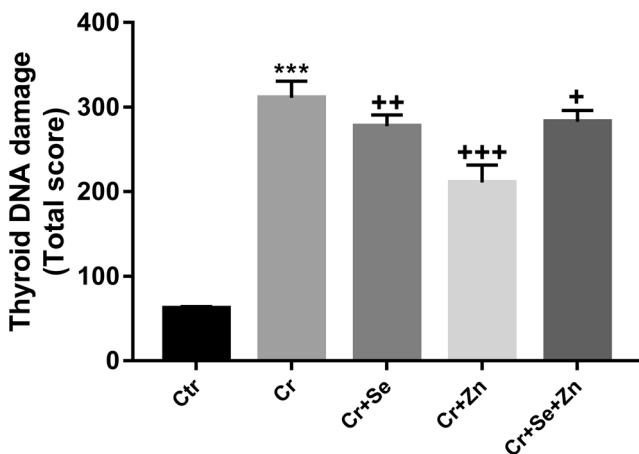


Fig. 2 Effects of Se and ZnCl₂ on thyroid DNA fragmentation induction in K₂Cr₂O₇-treated Wistar albino pregnant rats. Values are expressed as mean ± SEM, (n = 6). p < 0.05 considered statistically significant, (*) statistically significant compared with the control. (+) statistically significant compared with the K₂Cr₂O₇-treated group

group demonstrated normal thyroid parenchyma composed mainly by follicles of variable sizes with the predominance of larger ones (macrofollicles), filled with eosinophilic colloid composed mostly of thyroglobulin and surrounded by a monolayer of flattened epithelium lining composed of thyrocytes. The interfollicular space was thin contained connective tissue with capillaries beds and clustered parafollicular cells. The epithelial cell height was normal (Fig. 3a).

In the Cr-treated group, the thyroid parenchyma appeared less well organized, it was characterized by the predominance of microfollicles, the desquamation of the epithelial lining, and disruption of the follicular walls led to the collapse of many follicles. In addition, their colloid matter was filled by exfoliated cells. The epithelial cells seemed hyperplastic and vacuolated, the colloid was diluted and reduced remarkably, and the presence of the resorption vacuoles was evident at the periphery of follicles. The connective tissue was disintegrated, the follicular area was reduced and the interfollicular space was massively enlarged (Fig. 3b–f)

In the Cr + Se-treated group, the histopathological findings showed an improvement in restoring the normal architectural pattern of the thyroid gland, the follicles were rather large and filled with rich colloid, they were lined with a flat epithelium, and the interfollicular space was not apparent. However, there are some follicles where the lumen is filled with squamous cells and microfollicles with slightly vacuolated epithelial cells (Fig. 3g, h).

In the Cr + Zn-treated group, the microscopic analysis showed that apart from the presence of some vacuoles at the edges of the colloidal matter, the administration of ZnCl₂ has almost restored the thyroid histoarchitecture of pregnant Wistar rats exposed to K₂Cr₂O₇ (Fig. 3i, j).

In the Cr + Se + Zn-treated group, the thyroid slices showed the presence of microfollicles, their epithelial cells height was increased, and the colloid was exceedingly vacuolated. The collapsed follicles merged with neighboring ones due to the desquamation of the epithelial lining. Whereas the administration of ZnCl₂ or Se alone in the thyroid of K₂Cr₂O₇-treated pregnant rats exhibited marked protective effects, the concomitant administration of both of them was less effective in restoring thyroid histoarchitecture based on our findings (Fig. 3k, l).

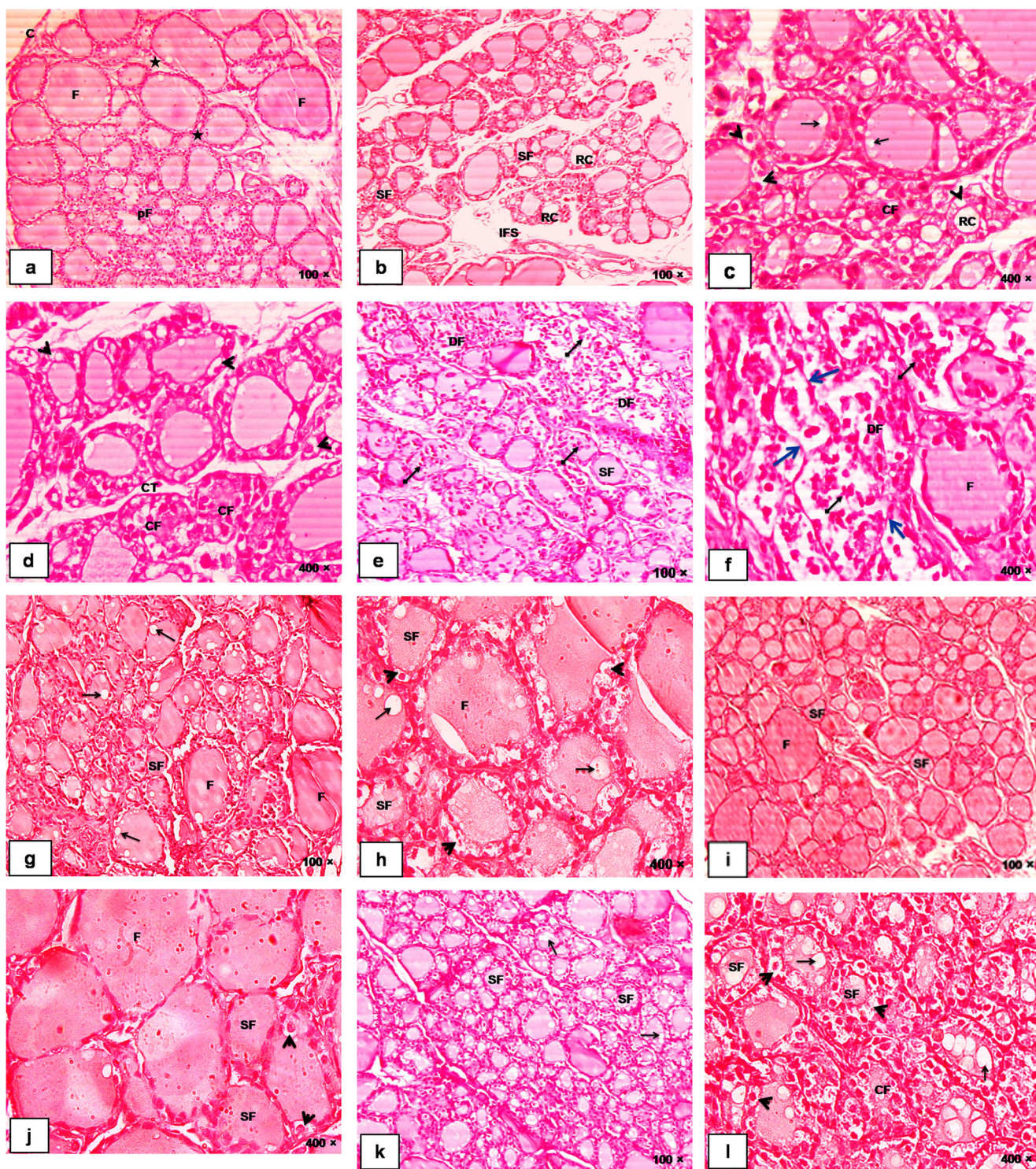


Fig. 3 Photomicrographs of thyroid gland sections of preimplanted Wistar rats stained with H&E; thyroid parenchyma appeared well organized; covered by a capsule (c) and composed of follicles with the preponderance of macrofollicles (F), parafollicular cells (pF) and connective tissue (star) in the control group (a). thyroid sections of Cr-treated group (b–f) revealed disorganized thyroid parenchyma with the presence of microfollicles with swollen epithelial cells (SF), reduced colloid matter (RC), wide interfollicular space (IFS), vacuolated colloid matter

(thin arrow), squamous hyperplastic epithelial cells (arrow head), collapsed and scattered follicles with exfoliated epithelium (CF), the dissolution of the connective tissue (CT), desquamated epithelial cells in colloid (DF), degenerated follicles filled with squamous cells (DF), disruption of the epithelial lining (blue thick arrow). Thyroid sections of Cr + Se (g, h), Cr + Zn (i, j), and Cr + Se +Zn (k, l) showed remarkable improvement with the persistence of vacuolated colloid and thyrocytes, and some collapsed follicles

Discussion

The results of the hormonal profile TSH, T3 and T4 revealed that the subcutaneous exposure to $K_2Cr_2O_7$ provoked peripheral hypothyroidism as indicated by a significant increase in plasma TSH and a significant decrease in plasma T3 and T4 levels, even though during gestation, the thyroid hormonal status witnesses hyperthyroidism that accommodates the presence of the fetal and placental tissues. Indeed, the gestational exposure to methimazole induced maternal hypothyroidism, which affected thyroid function and growth rate in suckling pups (Ben Amara et al. 2009). Consistently, multiple related studies have shown that $K_2Cr_2O_7$ caused hypothyroidism by disturbing T3, T4, and TSH levels in Wistar albino male rats (ElBakry and Tawfik 2014; Mahmood et al. 2010). Additionally, $K_2Cr_2O_7$ can affect the anterior pituitary gland and alters the hypothalamic-pituitary axis along with the proper functioning of the endocrine system (Quinteros et al. 2007).

Indeed, the reduction of the T4 plasma level observed in this study can be attributed to the inhibition of its synthesis by the thyroid. Thyroid iodine uptake is an essential step in gland hormonogenesis. Hence, it may be vulnerable to the damaging effects of thyroid disruptors (Boas et al. 2006). It was reported that methimazole induced a decrease in the intrathyroidal iodine pool through impairing its uptake in the thyroid gland of lactating Wistar rats (Ben Amara et al. 2009). Further, it was indicated in several studies that methimazole exhibits hypothyroidism by depleting the enzymatic activity of thyroid peroxidase (TPO) in catalyzing the incorporation of iodide into tyrosine residues on thyroglobulin (Dorea 2002). Instead, methimazole competes with thyroglobulin and acts as a substrate for TPO. Once iodinated, it is metabolized peripherally, resulting in thyroid iodine store reduction (Mitchell and Pearce 2019). In addition to that, several chemicals have disturbed the human TPO activity in vitro (Song et al. 2012). Furthermore, both TPO and dual oxidase are inactivated by the increased amounts of H_2O_2 generated via oxidative stress, causing a conformational change and leading to a less active form of the enzymes (Fortunato et al. 2010). As well, cadmium, another thyroid-disrupting heavy metal have altered gene expression related to the hypothalamic-pituitary-thyroid axis by upregulating TSH and thyroglobulin mRNA, and downregulating the expression of both thyroid hormone receptors $ThR\beta$ and $ThR\alpha$ in fish (Li et al. 2014). Moreover, many authors suggested that cadmium influences the production and/or the secretion of T4 by the induction of oxidative phosphorylation disorders in the mitochondria of thyrocytes (Hammouda et al. 2008; Prakash et al. 1997; Yoshizuka et al. 1991).

The declined plasma T3 levels demonstrated by our results, suggest that $K_2Cr_2O_7$ influences negatively the enzymes implicated in the extrathyroidal metabolism of thyroid hormones such as the 5' monodeiodinase, which catalyzes the

conversion of T4 to the active T3. This can be confirmed by previous investigations on rats and mice treated with cadmium (Chaurasia et al. 1996; Gupta et al. 1997). Consequently, the inhibition of the 5' monodeiodinase is associated with cadmium-induced lipid peroxidation, which affects the cell membrane integrity including the enzyme's binding sites (Chaurasia et al. 1996). This hormonogenesis impairment might be explained, according to previous studies, by the fact that CrVI exerts its toxicity by generating oxidative stress. Indeed, thyrocytes are supposed to be highly sensitive to disruptions in the endoplasmic reticulum homeostasis due to their secretory function. Therefore, the expression of genes involved in thyroid hormone synthesis and their transcriptional regulators are downregulated in thyrocytes during endoplasmic reticulum stress, causing hormone synthesis depletion (Wen et al. 2017). Accordingly, the present study revealed that $K_2Cr_2O_7$ -induced thyroidal oxidative stress in pregnant Wistar rats.

Consistently, it was reported that $K_2Cr_2O_7$ induced hepatic oxidative stress by mitochondrial dysfunction and antioxidant defense system depletion (Garcia-Nino et al. 2013). Lipids and fatty acids are sensitive to the oxidative action of free radicals. Therefore, the amplified production of free radicals associated with CrVI toxicity is responsible for the increased lipid peroxidation in the uterus, ovary, kidney, and liver of rabbit does (Mary-Momo et al. 2019), which concurs with the increased malondialdehyde level in our study. Hence, metal ions are thought to exacerbate the oxidation of polyunsaturated fatty acids by the means of generated ROS; they attack fatty acids in cellular membranes and induce lipid peroxidation, which leads to membrane structural and functional deterioration (Sole et al. 1990; Zhang et al. 2009).

In addition to their cytotoxic potential, lipid peroxidation products along with free radicals can alter protein structure (Poli et al. 2008). According to our study, $K_2Cr_2O_7$ increased protein carbonyl level in the thyroid. Protein carbonylation is the outcome of proteins' oxidative modification by free radicals, which leads to their structural integrity and catalytic activity impairment (Stadtman and Levine 2006); this could be attributed to heavy metal-induced oxidative stress, which is considered to be a prime pathway for protein homeostasis disturbance (Winterbourn and Hampton 2008). Indeed, CrVI is known to trigger oxidative protein damage. In addition, it affects mRNA translation thus results in a defective protein structure (Holland et al. 2007; Sumner et al. 2005).

The interaction of free radicals, aldehydes derived from lipid peroxidation, and protein carbonyls with DNA may lead to the hydrolysis of chemical bonds, resulting in DNA fragmentation (De Bont and van Larebeke 2004). Hence, metals tend to bind primarily with DNA and nuclear proteins, thus leading to the oxidative deterioration of biomolecules (Flora et al. 2008). Indeed, it has been reported that DNA is potentially susceptible to Fenton reaction substrates. Consistently,

increased DNA damage and oxidized nucleosides were detected in both nuclear and mitochondrial DNA of porcine thyroid under oxidative stress conditions (Stepniak et al. 2013; Karbownik-Lewińska et al. 2012). CrVI imposes its genotoxicity and mutagenicity by different mechanisms; it binds to DNA and affects genome stability by interacting with base pairing and stacking process which allows mutations to occur (Fang et al. 2014). Thus, DNA oxidative damage has been observed in several tissues after CrVI oral exposure in mice (Sekihashi et al. 2001); these findings coincided with the genotoxic effect of $K_2Cr_2O_7$ observed in the current study. Interestingly, the increased oxidative damage to macromolecules in the thyroid gland upon exposure to exogenous or endogenous prooxidants is considered to be a substantial contributor to the development of different thyroid diseases (Karbownik-Lewinska and Kokoszko-Bilska 2012).

Thyroid cells are thought to have an important antioxidant enzymatic system that is responsible for degrading and scavenging free radicals (Bjijrkman and Ekholm 1995). In response to oxidative stress against toxicants, the activities of the antioxidant enzymes are upregulated to protect cellular components against oxidation (Kubrak et al. 2010), which is confirmed by our findings, the activities of CAT, SOD, GPx, and GST were increased significantly in the thyroid of pregnant rats.

The detoxifying process of ROS commonly implies the conversion of superoxide to hydrogen peroxide catalyzed by SOD (Fridovich 1986). Hydrogen peroxide is either decomposed to water and disulfide glutathione by GPx (Kesheri et al. 2014) or metabolized to water and free oxygen by CAT (Knight, 1997). Thus, the restorative effect of cell redox homeostasis exhibited by these enzymes could explain their increased activities upon $K_2Cr_2O_7$ exposure in our study. Similarly, CrVI exposure increased SOD and GPx mRNA levels in zebra fish to eliminate free radicals, which concurs with our results (Jin et al. 2015). Moreover, the activities of the antioxidant enzymes SOD and CAT were increased upon CrVI administration in rats and fish tissues (Patlolla et al. 2009; Kumari et al. 2014). GST plays an essential role in initiating the neutralization of alkylating agents by catalyzing the conjugation of toxicants with the SH group of glutathione, thereby facilitating their elimination (Dorval et al. 2003). Regarding the increased GST activity determined in the present study, a similar increase in GST activity upon CrVI exposure was determined in fish (Ciacci et al. 2012; Kim and Kang 2016).

Concordantly to $K_2Cr_2O_7$ -induced thyroidal oxidative stress observed in the present study, the results of the histological examination showed that $K_2Cr_2O_7$ has altered the thyroid histoarchitecture. Indeed, the thyroid parenchyma appeared highly disorganized, with unevenness in follicles diameter and form. The presence of microfollicles was more preponderant than the larger ones. These findings were in accordance with other studies (Mahmood et al. 2010;

Elbakry and Tawfik 2014). In addition, the desquamation of the epithelial lining of the follicles was noticed, which led to the disruption of the follicular walls and provoked their collapse. Moreover, the colloid that serves as a pool for thyroid hormones seemed to be diluted and reduced considerably, which may explain the decline in thyroid hormone levels in pregnant Wistar rats and as reported previously by Elbakry and Tawfik 2014. Owing to the degeneration of follicles and the reduction of the follicular area, the interfollicular space has been enlarged massively. This widening has been seen in the thyroid of male, nonpregnant rats and mice, respectively, treated with $K_2Cr_2O_7$ (Hala et al. 2016), aluminum (Aktac and Bakar 2002), and cadmium (Pilat Marcinkiewicz et al. 2003). As regards thyrocytes, they appeared hyperplastic and highly vacuolated, as reported also by Hala et al. 2016. Thyrocytes hyperplasia may be due to the resultant increase in circulating levels of TSH. Indeed, this later is known as the primary stimulus for thyroid hormonogenesis. Herein, the overstimulation of thyroid follicular epithelium may lead to thyrocytes hypertrophy and hyperplasia (Gaide Chevronnay et al. 2015). Additionally, thyroid weight has increased significantly upon $K_2Cr_2O_7$ exposure. Indeed, several thyroid-disrupting chemicals have caused an increase in thyroid absolute weight (Ben Amara et al. 2009; Yang et al. 2013). It is well known that thyroid hormones promote growth. Thus, the decrease in maternal body weight observed in the current study could be attributed to $K_2Cr_2O_7$ -induced hypothyroidism. Consistently, similar findings were reported in nickel chloride-exposed preimplanted Wistar rats and pups of methimazole-treated pregnant rats (Adjroud 2013; Ben Amara et al. 2009).

Previous studies have shown that the administration of antioxidant substances has mitigated CrVI-induced toxicity (Chandra et al. 2007; Goodarzi et al. 2017; Saber et al. 2015). Thus, the co-administration of Se and $ZnCl_2$ or both of them combined has counterbalanced $K_2Cr_2O_7$ -induced thyroid hormonal disruption, oxidative stress, DNA fragmentation, and histological alterations in pregnant Wistar rats. $ZnCl_2$ cotreatment improved plasma TSH, T3, and T4 levels significantly; this could be explained by the indispensability of Zn, not only for the activity of the enzymes that convert T4 to its active form through its antioxidant properties but also for the synthesis of TSH in the anterior hypophysis and the thyrotropin-releasing hormone in the hypothalamus (Brandao-Neto et al. 2006; Danforth and Burger 1989; Pekary et al. 1991). Moreover, thyroid structural integrity was restored remarkably in the Cr + Zn group. Similarly, it was reported that Zn administration in pregnant and lactating rats has attenuated arsenic-induced kidney histological lesions in their pups (Nassiry Zarrin Ghabaee et al. 2017). Moreover, supporting our results, it was reported that Zn supply alone or in combination with Se has improved body weight gain and reversed relative thyroid weight changes in cadmium-treated

Wistar rats (Hammouda et al. 2008). Further to this, Zn was found to exhibit a protective effect against nickel-induced glutathione and lipid peroxidation in brain cells of mice (Šulinskiene et al. 2019). As well, Zn plays a vital role in cell defense against free radicals; as being a cofactor of Cu/Zn SOD, a regulator of GPx activity, and a potent inducer of metallothionein expression (Cruz et al. 2015; Lima and Sampaio 2011; Oteiza et al. 1996), the antiradical efficacy of Zn against cadmium-induced oxidative stress, apoptosis, and necrosis was reported by several studies (Jacquillet et al. 2006; Jihen et al. 2010; Rogalska et al. 2009). Furthermore, Zn exhibited a marked impact in maintaining DNA integrity by preventing its oxidative damage and promoting its repair (Ho et al. 2003). Thereby, the prophylactic treatment with Zn promoted DNA repair in HeLa cells by revoking the inhibition of DNA-protein interactions exerted by cadmium (Hartmann and Hartwig 1998).

Analogously, based on our study, Se cotreatment enhanced thyroid hormonal and histological status and exhibited antioxidant and genoprotective effects. Indeed, this improvement can be explained by the fact that Se is a key trace element that takes a major part in maintaining thyroid homeostasis. Thus, enhanced T3 plasma concentration in Se-cotreated group could be attributed to an upregulation of DIOI (deiodinase I) and an increase in the conversion of T4 to T3 (Thomson et al. 2009). Therefore, the alterations in the quantity of DIOI mRNA in rat liver caused DIOI activity impairment and thyroid dysfunction (Berry et al. 1991). Likewise, when Se was supplemented to the diet of methimazole-treated rats, the T4 plasma level was ameliorated partially, while the T3 level was returned to normal. As well, Se promoted a partial recovery in body weights of both mothers and pups, which concurs with our findings (Ben Amara et al. 2009). Additionally, in agreement with our results, Hala et al. (2016) reported that Se prevented CrVI-induced morphological alterations in the thyroid gland. Further, it was reported that Se counterbalanced lead acetate-induced lipid peroxidation and glutathione reduction in the thyroid of male rats (Atteia et al. 2018). Similarly, Hassanin et al. (2013) highlighted the antioxidant and anti-apoptotic effects of Se against CrVI-induced oxidative stress and fibrosis, this concurs with the fact that Se participates actively in the antioxidant system. It may be considered an exogenous scavenger of ROS formed in the thyroid after CrVI exposure (Hala et al. 2016). Moreover, it is incorporated in many Se-dependent antioxidant enzymes that protect thyrocytes from oxidative damage (Winther et al. 2015). Therefore, improving free radical scavenging, antioxidant defense, and metal chelating were proven to be major contributors to Se-induced protection against $K_2Cr_2O_7$ toxicity (Soudani et al. 2010).

Although the synergistic effect of Se and Zn was more effective against cadmium-induced thyroid dysfunction and kidney oxidative damage in male Wistar rats (Hammouda et al. 2008;

Messaoudi et al. 2009), the combined administration of Se and $ZnCl_2$ in this study exhibited less thyroprotective effects in pregnant rats exposed to $K_2Cr_2O_7$ compared with the co-treatment with Se or $ZnCl_2$ alone. In this way, several studies reported that the interaction between exogenous antioxidants may exert prooxidant effects at high doses or in the presence of metal ions (Bouayed and Bohn 2010).

Conclusions

In conclusion, the present study revealed that the acute exposure to $K_2Cr_2O_7$ via the subcutaneous administration induced hypothyroidism, oxidative stress, DNA damage, and histological alterations in the thyroid gland. However, the cotreatment of Se and $ZnCl_2$ has mitigated $K_2Cr_2O_7$ -induced thyrotoxicity by promoting free radical scavenging and restoring thyroid homeostasis in pregnant Wistar rats. Owing to the growing use of Cr compounds in the industrial field, the exposure risk to CrVI in workers increased. Thus, Se and Zn could be used as protective agents to counterbalance CrVI-induced toxic effects. However, effective thyro-protection requires further investigations using different doses and routes of exposure on the synergetic interaction of Se and Zn.

Author contributions Anfal Fedala and Ounassa Adjroud designed the experiment; Anfal Fedala and Rim Timoumi performed the experiment; Anfal Fedala, Ounassa Adjroud, Salwa Abid-Essefi, and Rim Timoumi analyzed the data; Anfal Fedala and Ounassa Adjroud wrote the manuscript; Ounassa Adjroud and Salwa Abid-Essefi revised the manuscript; and all authors read and approved the final manuscript.

Funding This work was supported by the DGRSDT/MESRS (code: N° E2212600).

Data availability The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

Compliance with ethical standards

Ethical approval All procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Batna University.

Informed consent Not applicable.

Competing interests The authors declare that they have no competing interests.

References

- Adjroud O (2009) Effects of potassium dichromate on haematological parameters in female and male Wistar albino rats. *Ass Univ Bull Environ Res* 12:2
- Adjroud O (2010) Protective effects of selenium against potassium dichromate-induced hematotoxicity in female and male Wistar albino rats. *Ann Toxicol Anal* 22:165–172

- Adjroud O (2013) The toxic effects of nickel chloride on liver, erythropoiesis, and development in *Wistar* albino preimplanted rats can be reversed with selenium pretreatment. *Environ Toxicol* 28(5):290–298. <https://doi.org/10.1002/tox.20719>
- Aktac T, Bakar E (2002) The histopathological changes in the mouse thyroid depending on the aluminium. *Cell Mol Biol* 1:69–72
- Atteia HH, Arafa MH, Prabakar K (2018) Selenium nanoparticles prevent lead acetate-induced hypothyroidism and oxidative damage of thyroid tissues in male rats through modulation of selenoenzymes and suppression of miR-224. *Biomed Pharmacother* 99:486–491
- Bancroft JD, Gamble M (2008) Theory and practice of histological techniques, 6th edn. Churchill Livingstone, Elsevier, China
- Barceloux DG (1999) Zinc. *J Toxicol Clin Toxicol* 37(2):279–292
- Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 44:276–287
- Ben Amara I et al (2009) Effect of selenium on hypothyroidism induced by methimazole (MMI) in lactating rats and their pups. *Acta Biol Hung* 61(2):145–157
- Ben Hamida F, Soussia L, Guermazi F, Rebai T, Zeghal N (2001) Effets de deux antithyroïdiens (propylthiouracile et perchlorate) sur la fonction thyroïdienne de la souris en période d'allaitement. *Ann Endocrinol* 62:446–453
- Berry MJ, Banu L, Larsen PR (1991) Type I iodothyronine deiodinase is a selenocysteine-containing enzyme. *Nature* 349(6308):438–440
- Betsy A, Binitha MP, Sarita S (2013) Zinc deficiency associated with hypothyroidism: an overlooked cause of severe alopecia. *Int J Trichology* 5(1):40–42
- Bjijrkman U, Ekholm R (1995) Hydrogen peroxide degradation and glutathione peroxidase activity in cultures of thyroid cells. *Mol Cell Endocrinol* 111:99–107
- Boas M, Feldt-Rasmussen U, Skakkebaek NE, Main KM (2006) Environmental chemicals and thyroid function. *Eur J Endocrinol* 154:599–611
- Bouayed J, Bohn T (2010) Exogenous antioxidants-double-edged swords in cellular redox state: health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative Med Cell Longev* 3(4):228–237
- Bradford M (1979) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Brandao-Neto J et al (2006) Lack of acute zinc effect on thyrotropin-releasing hormone-stimulated thyroid-stimulating hormone secretion during oral zinc tolerance test in healthy men. *Nutr Res* 26:493–496
- Buha A, Antonijević B, Bulat Z, Jačević V, Milovanović V, Matović V (2013) The impact of prolonged cadmium exposure and co-exposure with polychlorinated biphenyls on thyroid function in rats. *Toxicol Lett* 221:83–90
- Chandra KA et al (2007) Effect of curcumin on chromium-induced oxidative damage in male reproductive system. *Environ Toxicol Pharmacol* 24(2):160–166
- Chaurasia SS, Gupta P, Kar A, Maiti PK (1996) Free radical mediated membrane perturbation and inhibition of type-I iodothyronine 5 α -monodeiodinase activity by lead and cadmium in rat liver homogenate. *Biochem Mol Biol Int* 39:765–770
- Ciacci C et al (2012) Effects of sublethal, environmentally relevant concentrations of hexavalent chromium in the gills of *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol* 120–121:109–118
- Clairbone A (1985) Catalase activity. Press Boca Rton FL, Handbook of methods for oxygen radical research. CRC, pp 283–284
- Cohen M et al (1993) Mechanisms of chromium carcinogenicity and toxicity. *Crit Rev Toxicol* 23:255–281
- Collins AR, Dusinská M, Gedik CM, Stětina R (1996) Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environ Health Perspect* 104:465–469
- Cruz KJ, de Oliveira AR, Marreiro Ddo N (2015) Antioxidant role of zinc in diabetes mellitus. *World J Diabetes* 6(2):333–337
- Danforth E Jr, Burger AG (1989) The impact of nutrition on thyroid hormone physiology and action. *Annu Rev Nutr* 9:201–227
- De Bont R, van Larebeke N (2004) Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis* 19(3):169–185
- Dorea JG (2002) Iodine nutrition and breast feeding. *J Trace Elem Med Biol* 16:207–220
- Dorval J, Leblond VS, Hontela A (2003) Oxidative stress and loss of cortisol secretion in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed in vitro to endosulfan, an organochlorine pesticide. *Aquat Toxicol* 63:229–241
- Dumitrescu AM, Liao XH, Abdullah MSY, Lado-Abeal J, Majed FA, Moeller LC, Boran G, Schomburg L, Weiss RE, Refetoff S (2005) Mutations in the SBP2 gene produce abnormal thyroid hormone metabolism in man. *Nat Genet* 37(11):1247–1252
- ElBakry RH, Tawfik SM (2014) Histological study of the effect of potassium dichromate on the thyroid follicular cells of adult male albino rat and the possible protective role of ascorbic acid (vitamin C). *J Microsc Ultrastruct. Environ Monit* 14:2121–2126
- Elia A, Dörr A, Mastrangelo C, Prearo M, Abete M (2006) Glutathione and antioxidant enzymes in the hepatopancreas of crayfish *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) of Lake Trasimeno (Italy). *Bulletin Francais de la Pêche ET de la Protection des Milieux Aquatiques*, pp 1351–1361. <https://doi.org/10.1051/kmae:2006040>
- Elia A, Dörr A, Prearo M, Taticchi M, Abete M (2007) Detoxification enzymes of freshwater crayfish *Procambarus clarkii* fed a diet enriched in selenium: preliminary results. *Marine Freshwater Physiol Behav* 40:195–199
- Fang Z, Zhao M, Zhen H, Chen L, Shi P, Huang Z (2014) Genotoxicity of tri- and hexavalent chromium compounds in vivo and their modes of action on DNA damage in vitro. *PLoS One* 9(8):e103194
- Farooqi L, Mazeto GMFS, Shuhama T, Brandão-Neto J (2000) Effects of a single venous dose of zinc on thyroid status in healthy individuals and patients with Graves' disease. *Metal-Based Drugs* 7:151–155
- Flohe L, Gunzler W (1984) Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 105:114–121
- Flora SJ (2009) Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxidative Med Cell Longev* 2(4):191–206
- Flora SJS, Mittal M, Mehta A (2008) Heavy metal induced oxidative stress and its reversal by chelation therapy. *Indian J Med Res* 128:501–523
- Fortunato RS, Lima de Souza EC, Hassani RAE, Boufraqueh M, Weyemi U, Talbot M, Lagente-Chevallier O, de Carvalho DP, Bidart JM, Schlumberger M, Dupuy C (2010) Functional consequences of dual oxidase-thyroperoxidase interaction at the plasma membrane. *J Clin Endocrinol Metab* 95(12):5403–5411
- Fridovich I (1986) Biological effects of the superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* 247(1):1–11
- Gaide Chevronnay HP, Janssens V, van der Smissen P, Liao XH, Abid Y, Nevo N, Antignac C, Refetoff S, Cherqui S, Pierreux CE, Courtoy PJ (2015) A mouse model suggests two mechanisms for thyroid alterations in infantile cystinosis: decreased thyroglobulin synthesis due to endoplasmic reticulum stress/unfolded protein response and impaired lysosomal processing. *Endocrinology* 156(6):2349–2364. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1672>
- García-Niño WR et al (2013) Curcumin pretreatment prevents potassium dichromate-induced hepatotoxicity, oxidative stress, decreased respiratory complex I activity, and membrane permeability transition pore opening. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013:424692
- Gilbert ME, Rovet J, Chen Z, Koibuchi N (2012) Developmental thyroid hormone disruption: prevalence, environmental contaminants and neurodevelopmental consequences. *Neurotoxicol* 33:842–852
- Goodarzi Z, Karami E, Ahmadizadeh M (2017) Simvastatin attenuates chromium-induced nephrotoxicity in rats. *Nephropathol* 6(1):5–9

- Gupta P, Chaurasia S, Maiti P, Kar A (1997) Cadmium induced alterations in extrathyroidal conversion of thyroxine to triiodothyronine by type-I iodothyronine 59-monodeiodinase in male mouse. *Horm Metab Res* 29:151–152
- Hadie SNH, Abdul-Manan H, Abdulla S (2013) Thyroid gland resection in euthanised rat: a practical guide. *Intern Med J* 20(1):1–4
- Hala ZE, Ibrahim KR, Hemmat HG (2016) A histological study on the possible protective effect of selenium against chromium-induced thyrotoxicity in adult male albino rats. *The Egyptian Journal of Histology* 39(1)
- Hammouda F, Messaoudi I, el Hani J, Baati T, Saïd K, Kerkeni A (2008) Reversal of cadmium-induced thyroid dysfunction by selenium, zinc, or their combination in rat. *Biol Trace Elem Res* 126:194–203
- Hartmann M, Hartwig A (1998) Disturbance of DNA damage recognition after UV-irradiation by nickel (II) and cadmium(II) in mammalian cells. *Carcinogenesis* 19:617–621
- Hassanin KM, Abd El-Kawi SH, Hashem KS (2013) The prospective protective effect of selenium nanoparticles against chromium-induced oxidative and cellular damage in rat thyroid. *Int J Nanomedicine* 8:1713–1720
- Ho E, Courtemanche C, Ames BN (2003) Zinc deficiency induces oxidative DNA damage and increases P53 expression in human lung fibroblasts. *J Nutr* 133(8):2543–2548
- Holland S, Lodwig E, Sideri T, Reader T, Clarke I, Gkargkas K, Hoyle DC, Delneri D, Oliver SG, Avery SV (2007) Application of the comprehensive set of heterozygous yeast deletion mutants to elucidate the molecular basis of cellular chromium toxicity. *Genome Biol* 8(12):R268
- IARC (International Agency for Research on Cancer) (1990) Chromium, nickel and weldings. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 49: 1- 648.
- Jacquillet G et al (2006) Zinc protects renal function during cadmium intoxication in the rat. *Am J Physiol Ren Physiol* 290:127–137
- Jahnabi S, Choudhuri S, Choudhuri D (2017) Effect of subchronic exposure to chromium on hematological and biochemical parameters of male albino rat. *Asian J Pharm Clin Res* 10(5):345–348
- Jihen H et al (2010) Cadmium retention increase: a probable key mechanism of the protective effect of zinc on cadmium-induced toxicity in the kidney. *Toxicol Lett* 196(2):104–109
- Jin Y, Liu Z, Liu F, Ye Y, Peng T, Fu Z (2015) Embryonic exposure to cadmium (II) and chromium (VI) induce behavioral alterations, oxidative stress and immunotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicol Teratol* 48:9–17
- Käkelä R, Käkälä A, Hyvärinen H (1999) Effects of nickel chloride on reproduction of the rat and possible antagonistic role of selenium. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 123:27–37
- Karbownik-Lewińska M et al (2012) High level of oxidized nucleosides in thyroid mitochondrial DNA; damaging effects of Fenton reaction substrates. *Thyroid Res* 5:24
- Karbownik-Lewińska M, Kokozsko-Bilska A (2012) Oxidative damage to macromolecules in the thyroid - experimental evidence. *Thyroid Res* 5:25
- Kesheri M, Kanchan S, Sinha RP (2014) Isolation and in silico analysis of Fe-superoxide dismutase in the cyanobacterium *Nostoc commune*. *Gene* 553(2):117–125
- Khorsandi K, Rabbani-Chadegani A (2013) Studies on the genotoxic effect of chromium oxide (Cr VI): Interaction with deoxyribonucleic acid in solution. *Mutat Res* 750(1-2):105–110
- Kim JH, Kang JC (2016) Oxidative stress, neurotoxicity, and metallothionein (MT) gene expression in juvenile rock fish *Sebastes schlegelii* under the different levels of dietary chromium(Cr⁶⁺) exposure. *Ecotox Environ Safe* 125:78–84
- Knight JA (1997) Reactive oxygen species and the neuro-degenerative disorders. *Ann Clin Lab Sci* 27:11–25
- Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigó R, Gladyshev VN (2003) Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* 300:1439–1443
- Kubrak OI et al (2010) Chromium effects on free radical processes in gold fish tissues: comparison of Cr (III) and Cr (VI) exposures on oxidative stress markers, glutathione status and antioxidant enzymes. *Comp Biochem Phys C* 152(3):360–370
- Kumari K, Khare A, Dange S (2014) The applicability of oxidative stress biomarkers in assessing chromium induced toxicity in the fish *Labeo rohita*. *Biomed Res Int* 2014:782493
- Levis AG Bianchi V (1982) Mutagenic and cytogenetic effects of chromium compounds, in S.Langard (Ed.), Biological and environmental aspects of chromium, Amsterdam 171-208.
- Li ZH, Chen L, Wu YH, Li P, Li YF, Ni ZH (2014) Effects of waterborne cadmium on thyroid hormone levels and related gene expression in Chinese rare minnow larvae. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol* 161:53–57
- Lima VBS, Sampaio FA (2011) Parameters of glycemic control and their relationship with zinc concentrations in blood and with superoxide dismutase enzyme activity in type 2 diabetes patients. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 55:701–707
- Mahmood T, Qureshi IZ, Iqba MJ (2010) Histopathological and biochemical changes in rat thyroid following acute exposure to hexavalent chromium. *Histol Histopathol* 25(11):1355–1370
- Mary Momo CM, Ferdinand N, Omer Bebe N, Alexane Marquise M, Augustave K, Bertin Narcisse V, Herve T, Joseph T (2019) Oxidative effects of potassium dichromate on biochemical, hematological characteristics, and hormonal levels in rabbit doe (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet Sci* 6(1):30
- Mercier Y, Gatellier P, Renner M (2004) Lipid and protein oxidation in vivo, and antioxidant potential in meat from Charolais cows finished on pasture or mixed die. *Meat Sci* 66:467–473
- Messaoudi I, El Heni J, Hammouda F et al (2009) Protective effects of selenium, zinc, or their combination on cadmium-induced oxidative stress in rat kidney. *Biol Trace Elem Res* 130:152–161. <https://doi.org/10.1007/s12011-009-8324-y>
- Miller MD, Crofton KM, Rice DC, Zoeller RT (2009) Thyroid-disrupting chemicals: interpreting upstream biomarkers of adverse outcomes. *Environ Health Perspect* 117(7):1033–1041
- Mitchell AL, Pearce SHS (2019) Autoimmune thyroid diseases. In: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Schroeder HW, Frew AJ, Weyand CM (eds) Clinical immunology, principles and practice, 5th edn. Elsevier, Philadelphia, pp 947–956
- Monteiro C, Conceição S, Bastos V, Oliveira H (2019) Cr (VI) -induced genotoxicity and cell cycle arrest in human osteoblast cell line MG-63. *J Appl Toxicol* 1–9.
- Nasiry Zarrin Ghabaee D, Talebpour Amiri F, Esmaeelnejad Moghaddam A, Khalatbary AR, Zargari M (2017) Administration of zinc against arsenic-induced nephrotoxicity during gestation and lactation in rat model. *J Nephrothol* 6(2):74–80
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351–358
- Oteiza PL, Olin KL, Fraga CG, Keen CL (1996) Oxidant defense systems in testes from zinc deficient rats. *Exp Biol Med* 213:85–91
- Paksy K, Varga B, Lázár P (1996) Zinc protection against cadmium-induced infertility in female rats. Effect of zinc and cadmium on the progesterone production of cultured granulosa cells. *BioMetals* 10:27–36
- Patlolla AK, Barnes C, Yedjou C, Velma VR, Tchounwou PB (2009) Oxidative stress, DNA damage, and antioxidant enzyme activity induced by hexavalent chromium in Sprague-Dawley rats. *Environ Toxicol* 24(1):66–73
- Pekary AE, Lukaski HC, Mena I, Hershman JM (1991) Processing of TRH precursor peptides in rat brain and pituitary is zinc dependent. *Peptides* 12:1025–1032

- Pilat-Marcinkiewicz B et al (2003) Structure and function of thyroid follicular cells in female rats chronically exposed to cadmium. *Bulletin-Veterinary Institute in Pulawy* 47:157–163
- Poli G, Biasi F, Leonarduzzi G (2008) 4-hydroxynonenal—protein adducts: a reliable biomarker of lipid oxidation in liver diseases. *Mol Asp Med* 29:67–71
- Prakash P et al (1997) Superoxide anion radical production as a cadmium-mediated mechanism of toxicity in avian thyroid: An electron spins resonance study by spin trapping. *Comp Biochem Physiol Part C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 118:89–95
- Prasad S (2013) Discovery of human Zinc deficiency: Its impact on human health and disease. *Adv Nutr* 2:176–190
- Prasad AS, Bao B, Beck FWJ, Kucuk O, Sarkar FH (2004) Antioxidant effect of zinc in humans. *Free Radic Biol Med* 37:1182–1190
- Quinteros F, Poliandri A, Machiavelli L, Cabilla JP, Duvilanski BH (2007) In vivo and in vitro effects of chromium VI on anterior pituitary hormone release and cell viability. *Toxicol Appl Pharmacol* 218(1):79–87
- Richelmi P, Baldi C (1984) Blood levels of hexavalent chromium in rats. “In vitro” and “in vivo” experiments. *Int J Environ Anal Chem* 17(3–4):181–186
- Rodrigues-Pereira P et al. (2015) Influence of Organotin on thyroid morphophysiological status. *J Environ Health Sci*.
- Rogalska J, Brzóska MM, Roszczenko A, Moniuszko-Jakoniuk J (2009) Enhanced zinc consumption prevents cadmium-induced alterations in lipid metabolism in male rats. *Chem Biol Interact* 177:142–152
- Saber TM, Farag MR, Cooper RG (2015) Ameliorative effect of extra virgin olive oil on hexavalent chromium-induced nephrotoxicity and genotoxicity in rats. *Rev Med Vet* 166(1–2):11–19
- Sekihashi K, Sasaki T, Yamamoto A, Kawamura K, Ikka T, Tsuda S, Sasaki YF (2001) A comparison of intraperitoneal and oral gavage administration in comet assay in mouse eight organs. *Mutat Res-Gen Tox En* 493(1–2):39–54
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184–191
- Sole J et al (1990) In vivo effects of nickel and cadmium in rats on lipid peroxidation and ceruloplasmin activity. *Bull Environ Contam Toxicol* 44:686–691
- Song M, Kim YJ, Park YK, Ryu JC (2012) Changes in thyroid peroxidase activity in response to various chemicals. *J Environ Monit* 14(8):2121–2126
- Soudani N, Sefi M, Ben Amara I, Boudawara T, Zeghal N (2010) Protective effects of Selenium (Se) on Chromium (VI) induced nephrotoxicity in adult rats. *Ecotoxicol Environ Saf* 73(4):671–678. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.10.002>
- Soudani N, Ben Amara I, Sefi M, Boudawara T, Zeghal N (2011) Effects of selenium on chromium (VI)-induced hepatotoxicity in adult rats. *Exp Toxicol Pathol* 63(6):541–548
- Stadtman ER, Levine RL (2006) Protein Oxidation. *Ann N Y Acad Sci* 899(1):191–208
- Stepniak J et al (2013) Membrane lipids and nuclear DNA are differently susceptible to Fenton reaction substrates in porcine thyroid. *Toxicol in Vitro* 27:71–78
- Šulinskienė J et al. (2019) Effect of zinc on the oxidative stress biomarkers in the brain of nickel-treated mice. *Oxidative Med Cell Longev*
- Sumner ER, Shanmuganathan A, Sideri TC, Willetts SA, Houghton JE, Avery SV (2005) Oxidative protein damage causes chromium toxicity in yeast. *Microbiology* 151:1939–1948
- Thomson CD, Campbell JM, Miller J, Skeaff SA, Livingstone V (2009) Selenium and iodine supplementation: effect on thyroid function of older New Zealanders. *Am J Clin Nutr* 90:1038–1046
- Triggiani V et al (2009) Role of iodine, selenium and other micronutrients in thyroid function and disorders. *Endocr Metab Immune* 9(3):277–294
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160(1):1–40
- Wen G, Ringseis R, Eder K (2017) Endoplasmic reticulum stress inhibits expression of genes involved in thyroid hormone synthesis and their key transcriptional regulators in FRTL-5 thyrocytes. *PLoS ONE* 12(11):e0187561
- Winterbourn CC, Hampton MB (2008) Thiol chemistry and specificity in redox signalling. *Free Radic Biol Med* 45(5):549–561
- Winther KH, Bonnema SJ, Cold F, Debrabant B, Nybo M, Cold S, Hegedüs L (2015) Does selenium supplementation affect thyroid function? Results from a randomized, controlled, double-blinded trial in a Danish population. *Eur J Endocrinol* 172:657–667
- Yang H, Zhang W, Kong Q, Liu H, Sun R, Lin B, Zhang H, Xi Z (2013) Effects of pubertal exposure to thiazole-Zn on thyroid function and development in female rats. *Food Chem Toxicol* 53:100–104
- Yildiz A, Kaya Y, Tanriverdi O (2019) Effect of the interaction between selenium and zinc on DNA repair in association with cancer prevention. *J Cancer Prev* 24(3):146–154. <https://doi.org/10.15430/JCP.2019.24.3.146>
- Yoshizuka M, Mori N, Hamasaki K, Tanaka I, Yokoyama M, Hara K, Doi Y, Umezui YI, Araki H, Sakamoto Y, Miyazaki M, Fujimoto S (1991) Cadmium toxicity in the thyroid gland of pregnant rats. *Exp Mol Pathol* 55:97–104
- Zhang DW, Shao J, Lin J, Zhang N, Lu BJ, Lin SC, Dong MQ, Han J (2009) RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science* 325(5938):332–336

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.