



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*
Discipline ou spécialité : *Pathologie, toxicologie, génétique et nutrition*

Présentée et soutenue par *Julien LEGHAIT*
Le 15 décembre 2008

Titre : *Evaluation du potentiel perturbateur thyroïdien du fipronil
chez deux espèces : le rat et le mouton*

JURY

Monsieur le Professeur Arturo ANADÓN Rapporteur
Monsieur le Docteur Roger RAHMANI Rapporteur
Madame le Professeur Anne DUITTOZ Présidente
Monsieur le Professeur Bernard SALLES Examineur
Madame le Docteur Catherine VIGUIE Examinatrice
Madame le Professeur Véronique GAYRARD Examinatrice
Madame le Professeur Nicole HAGEN Membre invité

Ecole doctorale : *Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries*
Unité de recherche : *UMR181 Physiopathologie et Toxicologie Expérimentales, INRA, ENVT*
Directeur(s) de Thèse : *Madame le Docteur Catherine VIGUIE*
Madame le Professeur Véronique GAYRARD
Rapporteurs : *Monsieur le Professeur Arturo ANADÓN, Monsieur le Docteur Roger RAHMANI*

AVANT-PROPOS

Ces travaux de thèse ont fait l'objet, à l'heure actuelle, des publications et communications suivantes :

PUBLICATION

LEGHAIT, J., GAYRARD, V., PICARD-HAGEN, N., CAMP, M., PERDU, E., TOUTAIN, P. L., VIGUIE, C.

Fipronil-induced disruption of thyroid function in rats is mediated by increased total and free thyroxine clearances concomitantly to increased activity of hepatic enzymes, *Toxicology*, 255(1-2):38-44 (2009)

COMMUNICATION ORALE

LEGHAIT, J., GAYRARD, V., PICARD-HAGEN, N., COCHARD, N., TOUTAIN, P. L., VIGUIE, C.

Relevance or irrelevance of the rat model for the toxicological evaluation of thyroid disruptors ?, *10th International Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology* 29 Suppl.1 (2006) 325, Turin, Italy

POSTERS

LEGHAIT, J., GAYRARD, V., PICARD-HAGEN, N., TOUTAIN, P. L., VIGUIE, C.

Pertinence des modèles animaux pour l'évaluation toxicologique des perturbateurs thyroïdiens, *Journées d'Animation Scientifique du Département de Santé Animale INRA* (2007), Tours, France

LEGHAIT, J., GAYRARD, V., PICARD-HAGEN, N., PELISSIE, E., PUEL, S., TOUTAIN, P. L., VIGUIE, C.

Evaluation of fipronil-induced thyroid disruption in a TBG-expressing species, *ENDO2008 The Endocrine Society's 90th annual meeting* (2008), San Francisco, USA

A Monsieur le Professeur Arturo Anadón et Monsieur le Docteur Roger Rahmani pour avoir accepté de consacrer de leur temps à la lecture et à l'appréciation de ce manuscrit et aux membres du jury de thèse, Madame le Professeur Anne Duittoz et Monsieur le Professeur Bernard Salles, qui nous ont fait l'honneur de juger ce travail, hommage respectueux.

J'adresse tout particulièrement mes remerciements au Docteur Catherine Viguié qui m'a guidé et soutenu avec enthousiasme et dynamisme tout au long de cette thèse, à la fois pour la conception des expériences, leur réalisation technique et la valorisation de ce travail sous ses diverses formes. Qu'elle soit assurée de mes plus vifs remerciements.

J'adresse mes remerciements à Messieurs les Professeurs Pierre-Louis Toutain et Alain Bousquet-Mélou qui m'ont accueilli au sein de leur laboratoire et qui m'ont guidé tout au long de cette thèse par leurs précieux enseignements, notamment en pharmacocinétique. Qu'ils soient assurés de ma respectueuse considération.

Je souhaite également remercier les Professeurs Véronique Gayraud et Nicole Hagen pour leur aide technique et leurs conseils judicieux de relecture tout au long de cette thèse.

Je remercie Monsieur le Docteur Jean-Pierre Cravedi et Monsieur le Professeur Philippe Caron pour avoir jugé mon travail lors de leur participation à mon comité de thèse.

Je remercie le Docteur Thierry Pineau de l'UR 66 pour m'avoir permis de réaliser la partie expérimentale sur les puces ADN au sein de son laboratoire avec l'aide précieuse de son équipe : Alexandre Eveillard, Hervé Guillou, Frédéric Lasserre, Arnaud Polizzi. Merci à Pascal Martin qui a participé à l'analyse des puces et qui a patiemment répondu à mes questions.

Merci aux membres de la plateforme biopuces du génopôle de Toulouse pour leur accueil et leur aide, notamment Lidwine Trouilh et Delphine Labourdette.

A Elisabeth Perdu et Anne Hillenweck de l'UMR 1089 pour leur aide précieuse et leur contribution fructueuse à l'amélioration de mon premier article.

A Laurent Ferrier de l'UMR 1054 pour m'avoir permis de squatter un coin de paillasse et laissé à disposition le compteur pour les nombreux dosages RIA que j'ai réalisés.

A Bernard Joseph, mon précieux fournisseur de rats, sans qui j'aurais eu des difficultés à trouver des rats pour m'entraîner aux interventions chirurgicales et pour les dosages analytiques.

A Véronique Dupouy pour avoir mis à disposition ses compétences en biologie moléculaire qui ont contribué à l'avancement de la partie expérimentale sur les puces ADN et à l'équipe de biostatistique, Didier Concordet, Djèlil Chafai, Faousi Lyazrhi et Pascal Bourdaud'hui pour avoir répondu à mes interrogations.

A l'équipe de bioanalyse pour leur contribution essentielle à ce travail notamment Sylvie Puel pour les centaines d'échantillons qu'elle a dosé pour moi et Marlène Lacroix pour ses conseils de rédaction.

A toute l'équipe zootechnique : Sylvain Bruyas, Jean-Pierre Gau, Joseph Maligoy, Patrice Rouby et Valentin. Mention spéciale pour René Schan : c'était un plaisir de travailler dans la bergerie entretenue et décorée par tes soins!

Je tiens à remercier les étudiantes en thèse du laboratoire pour leur soutien moral et leur aide technique : Julie Antic, Delphine Bibbal, ma compagne de rédaction de manuscrit (ca y est, on l'a fait !!), Séverine Collet, Aude Ferran, Elisabeth Jeunesse pour son soutien et sa bonne humeur et Anne-Sylvie Kesteman notamment pour son aide précieuse à la pose de cathéters sur les rats. Merci à Isabelle Bargues, notre fournisseur officiel de gâteaux au chocolat !

Aux stagiaires, Sophie Courrège, Marion Camp, Elodie Pélissier, Valentina Rigo et Suad Elmegerhi, avec qui j'ai eu le plaisir de travailler et qui m'ont aidé dans la réalisation des différentes phases expérimentales.

Au personnel du laboratoire : Simone Baurès, Valérie Defforge, Olivia Moua, Christiane Mouilleron, Marie-Françoise Raymond et Jean-Paul Serthelon pour leur participation indirecte mais non moins indispensable !

A ma famille, qui m'a toujours fait confiance et m'a soutenu dans les études que j'ai entreprises.

A mes amis, la bande des joyeux lurons de l'INSA, ainsi que Luc, Sabrina, Céline et Cyril, Mic et Max.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES.....	9
LISTE DES TABLEAUX.....	10
LISTE DES ABREVIATIONS	11
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	13
1. LES PERTURBATEURS THYROÏDIENS.....	16
1.1 HISTORIQUE.....	16
1.2 ENJEUX SOCIO-ECONOMIQUES DES PERTURBATEURS THYROÏDIENS.....	17
1.3 ENJEUX SANITAIRES DES PERTURBATEURS THYROÏDIENS.....	18
1.3.1 <i>Troubles du développement</i>	18
1.3.2 <i>Carcinogenèse thyroïdienne</i>	18
1.3.3 <i>Perturbation thyroïdienne et fonction reproductrice</i>	19
1.4 ENJEUX SCIENTIFIQUES DES PERTURBATEURS THYROÏDIENS.....	20
2. LES MECANISMES D’ACTION DES PERTURBATEURS THYROÏDIENS.....	21
2.1 EFFETS DIRECTS SUR LA THYROÏDE.....	22
2.2 LES PROTEINES DE TRANSPORT.....	23
2.2.1 <i>La TBG</i>	23
2.2.2 <i>La transthyrétine</i>	25
2.2.3 <i>L’albumine</i>	25
2.2.4 <i>Perturbation thyroïdienne et protéines de transport</i>	26
2.3 LES MECANISMES DE CAPTURE CELLULAIRE DES HT.....	26
2.4 LES RECEPTEURS AUX HT.....	27
2.5 LE METABOLISME DES HT.....	27
2.5.1 <i>Les désiodases</i>	27
2.5.2 <i>Les enzymes de phase II : uridine diphospho-glucuronosyltransférases (UDPGT) et sulfotransférases</i>	28
3. LES MODELES D’ETUDES DES PERTURBATEURS THYROÏDIENS.....	30
3.1 LES TESTS <i>IN VITRO</i>	30
3.2 LES MODELES ANIMAUX D’ETUDE DES PERTURBATEURS THYROÏDIENS.....	31
3.2.1 <i>Les rongeurs</i>	31
3.2.2 <i>Xenopus laevis</i>	33
3.2.3 <i>Le mouton</i>	33
4. LE FIPRONIL.....	34
4.1 HISTORIQUE, LEGISLATION ET MODE D’ACTION.....	34
4.1.1 <i>Historique et législation</i>	34
4.1.2 <i>Mode d’action insecticide du fipronil</i>	34
4.2 METABOLISME ET TOXICOLOGIE.....	35
4.3 TOXICOLOGIE ENDOCRINIENNE.....	36
5. PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE LA THESE.....	37
CHAPITRE I : MATERIELS ET METHODES COMMUNS AUX DIFFERENTES ETUDES EXPERIMENTALES.....	39
1. ANIMAUX - CHIRURGIE - PRELEVEMENTS SANGUINS.....	41
1.1 EXPERIENCES REALISEES SUR LES RATS.....	41
1.2 EXPERIENCES REALISEES SUR LES MOUTONS.....	41
2. PRODUITS CHIMIQUES ET PREPARATION DES SOLUTIONS.....	42

3. DOSAGES.....	42
3.1 DOSAGES HORMONAUX.....	42
3.2 DOSAGE DE FIPRONIL ET FIPRONIL SULFONE	43
3.2.1 <i>Dosage par HPLC détection UV</i>	43
3.2.2 <i>Dosage du fipronil et fipronil sulfone par HPLC/MS/MS chez le rat</i>	44
3.2.3 <i>Dosage du fipronil et fipronil sulfone par HPLC/MS/MS chez le mouton</i>	45
3.3 DOSAGE DE L'ANTIPYRINE	46
4. ANALYSES PHARMACOCINETIQUES.....	47
5. DEVELOPPEMENT D'UN MODELE « EUTHYROÏDIEN » DEPOURVU DE T4 POUR EVALUER LA CLAIRANCE DE FT4 ET TT4 CHEZ LE RAT ET LE MOUTON.....	50
5.1 INTERET ET PRESENTATION DU MODELE.....	50
5.2 CONDITIONS EXPERIMENTALES	51
5.3 TABLEAU DE RESULTATS ET DISCUSSION	52
CHAPITRE II : CARACTERISATION DE LA PERTURBATION THYROIDIENNE ET MODE D'ACTION DU FIPRONIL SUR LA FONCTION THYROIDIENNE CHEZ LE RAT	55
1. INTRODUCTION.....	57
2. MATERIEL ET METHODES.....	59
2.1 TRAITEMENT AU FIPRONIL	59
2.2 CARACTERISATION DE L'EXPOSITION DE RATES AU FIPRONIL ET AU FIPRONIL SULFONE DANS NOS CONDITIONS DE TRAITEMENT	59
2.3 EXPERIENCE 1 : EFFET DU FIPRONIL SUR LES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES DES HT ET DE TSH.....	59
2.4 EXPERIENCE 2 : EFFET DU FIPRONIL SUR LES PARAMETRES PK DE LA T4	59
2.5 EXPERIENCE 3 : EFFET DU FIPRONIL SUR LES PARAMETRES PK DE L'ANTIPYRINE	60
2.6 EXPERIENCE 4 : EFFET DU FIPRONIL SUR L'ACTIVITE DE GLUCURONOCONJUGAISON DU 4-NITROPHENOL PAR LES UDPGT	60
2.7 ANALYSES STATISTIQUES.....	61
3. RESULTATS	61
3.1 CARACTERISATION DE L'EXPOSITION AU FIPRONIL ET AU FIPRONIL SULFONE	61
3.2 EXPERIENCE 1 : EFFET DU FIPRONIL SUR LES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES DES HT ET DE TSH.....	63
3.3 EXPERIENCE 2 : EFFET DU FIPRONIL SUR LES PARAMETRES PK DE LA T4	65
3.4 EXPERIENCE 3 : EFFET DU FIPRONIL SUR LES PARAMETRES PK DE L'ANTIPYRINE	66
3.5 EXPERIENCE 4 : EFFET DU FIPRONIL SUR L'ACTIVITE DE GLUCURONOCONJUGAISON DU 4-NITROPHENOL PAR LES UDPGT	67
4. DISCUSSION.....	68
CHAPITRE III : EVALUATION TOXICOLOGIQUE DU FIPRONIL SUR LA FONCTION THYROIDIENNE CHEZ LE MOUTON	73
1. INTRODUCTION.....	75
2. MATERIEL ET METHODES.....	76
2.1 ÉTABLISSEMENT D'UN SCHEMA POSOLOGIQUE DE TRAITEMENT AU FIPRONIL CHEZ LE MOUTON : DETERMINATION DES PARAMETRES PK DU FIPRONIL CHEZ LA BREBIS	76
2.2 EXPERIENCE 1: EFFET DU FIPRONIL SUR LES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES DES HT ET DE TSH.....	77
2.3 EXPERIENCE 2: EFFET DU FIPRONIL SUR LES PARAMETRES PK DE T4 DE BREBIS THX	78
2.4 EXPERIENCE 3: EFFET DU FIPRONIL SUR LES PARAMETRES PK DE T4 DE BREBIS THX+T3	78
2.5 EXPERIENCE 4: EFFET DU FIPRONIL SUR LES PARAMETRES PK DE L'ANTIPYRINE	79
2.6 ANALYSES STATISTIQUES.....	80

3. RESULTATS	80
3.1 EXPOSITIONS AU FIPRONIL ET AU FIPRONIL SULFONE DANS TOUTES LES EXPERIENCES	80
3.2 EXPERIENCE 1: EFFET DU FIPRONIL SUR LES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES DES HT ET DE TSH.....	84
3.3 EXPERIENCE 2: EFFET DU FIPRONIL SUR LES PARAMETRES PK DE T4 DE BREBIS THX	86
3.4 EXPERIENCE 3: EFFET DU FIPRONIL SUR LES PARAMETRES PK DE T4 DE BREBIS THX+T3	89
3.5 EXPERIENCE 4: EFFET DU FIPRONIL SUR LES PARAMETRES PK DE L'ANTIPYRINE	91
4. DISCUSSION.....	94
CHAPITRE IV : EXPLORATION PAR UNE APPROCHE TRANSCRIPTOMIQUE DES NIVEAUX D'INTERACTION POSSIBLES DU FIPRONIL SUR LA FONCTION THYROIDIENNE DU RAT.....	97
1. INTRODUCTION	99
2. MATERIEL ET METHODES	101
3. RESULTATS	102
3.1 EFFET DU FIPRONIL SUR LES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES DES HT ET DE TSH.....	102
3.2 TRAITEMENT DES DONNEES	103
3.3 GENES DIFFERENTIELLEMENT EXPRIMES DANS LA THYROÏDE ET FONCTIONS BIOLOGIQUES ASSOCIEES	104
4. DISCUSSION.....	108
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	111
BIBLIOGRAPHIE.....	121

LISTE DES FIGURES

<u>Figure 1</u> :	Sites d'interaction potentiels de xénobiotiques sur la fonction thyroïdienne	p.22
<u>Figure 2</u> :	Le fipronil et ses principaux métabolites	p.35
<u>Figure 3</u> :	Evolution des concentrations plasmatiques moyennes de fipronil et fipronil sulfone chez le rat lors d'un traitement au fipronil	p.62
<u>Figure 4</u> :	Effet d'un traitement au fipronil à 14 et 28 jours sur les concentrations plasmatiques moyennes des HT et de TSH	p.64
<u>Figure 5</u> :	Effet du fipronil sur l'évolution des concentrations plasmatiques de TT4 et FT4 au cours du temps	p.65
<u>Figure 6</u> :	Effet du fipronil sur l'évolution des concentrations plasmatiques moyennes d'antipyrine	p.67
<u>Figure 7</u> :	Concentrations plasmatiques moyennes de fipronil et fipronil sulfone dans chaque expérience	p.81
<u>Figure 8</u> :	Exemples représentatifs d'évolution temporelle des concentrations plasmatiques de fipronil expérimentales et de celles ajustées aux différents modèles PK	p.83
<u>Figure 9</u> :	Effet du traitement au fipronil sur les concentrations plasmatiques moyennes sur 24 h de TT4, TT3 et FT4 chez des béliers.....	p.85
<u>Figure 10</u> :	Effet du fipronil et du phénobarbital sur la décroissance des concentrations plasmatiques moyennes de TT4 et FT4 chez des brebis THX	p.87
<u>Figure 11</u> :	Effet du fipronil sur la décroissance des concentrations plasmatiques moyennes de TT4 et FT4 chez des brebis THX+T3	p.89
<u>Figure 12</u> :	Effet du fipronil et du phénobarbital sur la décroissance des concentrations plasmatiques moyennes d'antipyrine chez des brebis à thyroïde intacte	p.92
<u>Figure 13</u> :	Effet d'un traitement au fipronil de 14 jours sur les concentrations plasmatiques moyennes des HT et de TSH	p.102
<u>Figure 14</u> :	Histogramme normalisé des densités des valeurs de p	p.104

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1 : Concentrations plasmatiques des HT libres et totales, fraction libre et temps de demi-vie des HT chez l'homme, le mouton et le rat p.24
- Tableau 2 : Caractéristiques des protéines de transport des HT chez l'homme, le mouton et le rat p.25
- Tableau 3 : Valeurs des clairances de FT4, TT4 et des concentrations plasmatiques de TT3 obtenues dans notre modèle « euthyroïdien » dépourvu de T4 chez le rat et le mouton par rapport aux valeurs de la littérature p.52
- Tableau 4 : Concentrations plasmatiques moyennes de fipronil et fipronil sulfone de chaque expérience à la fin du traitement au fipronil p.62
- Tableau 5 : Effet du fipronil sur les paramètres PK moyens de TT4 et FT4 p.66
- Tableau 6 : Effet du fipronil sur les paramètres PK moyens d'antipyrine p.67
- Tableau 7 : Paramètres PK moyens de fipronil et fipronil sulfone chez la brebis après administration IV p.77
- Tableau 8 : Paramètres PK moyens de fipronil pour chaque expérience p.84
- Tableau 9 : Effet du fipronil et du phénobarbital sur les paramètres PK moyens de TT4 et FT4 chez la brebis THX p.88
- Tableau 10 : Effet du fipronil sur les paramètres PK moyens de TT4 et FT4 chez des brebis THX+T3 p.90
- Tableau 11 : Effet du fipronil sur les paramètres PK moyens d'antipyrine chez des brebis à thyroïde intacte p.93
- Tableau 12 : Effet du fipronil sur les paramètres PK moyens d'antipyrine chez des brebis à thyroïde intacte p.93
- Tableau 13 : Liste des 10 gènes les plus surexprimés et les 10 plus sous exprimés dans la thyroïde et leurs fonctions p.105-106
- Tableau 14 : Fonctions biologiques identifiées à partir des gènes différentiellement exprimés dans la thyroïde sous traitement au fipronil et gènes associés à ces fonctions p.107

LISTE DES ABREVIATIONS

AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
ARNm : ARN messenger
AUC : aire sous la courbe
AUMC : aire sous la courbe du premier moment statistique
BPA : bisphénol A
CAR : constitutive androstane receptor
CL : clairance
C_{max} : concentration maximale
C_{ss} : concentration plasmatique à l'état d'équilibre
CYP : cytochrome p450
DDT : dichlorodiphényltrichloroéthane
DIT : diiodotyrosine
EPA : Environmental Protection Agency
ET : écart type
FAO/WHO : Food and Agriculture Organization / World Health Organization
FT3 : triiodothyronine libre
FT4 : thyroxine libre
GABA : acide γ -amino-butérique
HCB : hexachlorobenzène
HPLC/MS : high performance liquid chromatography/mass spectrometry
HT : hormone thyroïdienne
IP : voie intrapéritonéale
IV : voie intraveineuse
LLOQ : limite inférieure de quantification
MCT : monocarboxylate transporter
MIT : monoiodotyrosine
MRM : multiple reaction monitoring
MRT : temps moyen de résidence
NIS : sodium iodide symporter
OATP : organic anion-transporting polypeptide
OECD : Organisation for Economic Cooperation and Development
PBB : polybromobiphényles

PBDE : polybrominated diphenyl ethers
PCB : polychlorobiphényles
PCDD : polychlorodibenzo-p-dioxines
PCDF : polychlorodibenzo-p-furanes
PCP : pentachlorophénol
PCR : polymerase chain reaction
PK : pharmacocinétique
PO : *per os*
POP : polluants organochlorés permanents
PTU : propylthiouracil
PXR : pregnane-X-receptor
QC : contrôle qualité
RIA : radioimmunologic assay
SC : sous cutané
 $T_{1/2}$: temps de demi-vie de la phase terminale
T3 : triiodothyronine
T4 : thyroxine
TBG : thyroxine-binding globulin
TCDD : 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine
THX : thyroïdectomisé
THX+T3 : thyroïdectomisé et traité à la T3
Tmax : temps d'occurrence de la concentration est maximale
TPO : thyroperoxydase
TR : thyroid receptor
TRH : thyrotropin releasing hormone
TSH : thyroid-stimulating hormone
TT3 : triiodothyronine totale
TT4 : thyroxine totale
TTR : transthyrétine
UDPGT : uridine diphospho-glucuronosyltransférase
USA : United States of America
UV : ultraviolet
Vss : volume de distribution à l'état d'équilibre

INTRODUCTION
BIBLIOGRAPHIQUE

D'après le comité européen de stratégie sur les perturbateurs endocriniens, un perturbateur endocrinien est une substance ou un mélange exogène qui altère une/des fonction(s) du système endocrinien et qui cause par conséquent des effets néfastes sur la santé d'un organisme intact, sur sa progéniture, ou sur une/des (sous) population(s) [1].

L'un des premiers signes d'alerte sur les perturbateurs endocriniens a été donné par Rachel Carson dans son livre *Silent Spring* (1962) dans lequel elle décrit les effets du dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) sur le déclin des populations d'oiseaux. Depuis, de nombreux rapports ont décrit des comportements et des développements anormaux du tractus génital chez les poissons et les reptiles causés par des polluants chimiques [2]. Chez l'homme, certaines données sanitaires sont préoccupantes et des incertitudes pèsent sur les facteurs étiologiques de certaines maladies. Une augmentation globale de l'incidence des cancers a été estimée en France à 35 % durant la période 1978-2000. Les facteurs étiologiques de certains cancers (testicules, cerveau...) et des cancers de l'enfant sont méconnus [3]. Une baisse de la fertilité humaine, de la qualité du sperme et une augmentation des cancers des testicules ont été mises en évidence, posant la problématique de l'impact des perturbateurs endocriniens sur la fertilité humaine [4].

Parmi les 100 000 substances chimiques recensées dans l'Union Européenne, moins de 3000 ont fait l'objet d'analyses approfondies quant à leurs propriétés toxiques et écotoxiques. L'étude de l'impact des produits chimiques sur la santé humaine et plus particulièrement sur l'intégrité des systèmes endocriniens représente donc un challenge face au développement et à l'utilisation croissants de nouvelles substances chimiques.

La plupart des études se sont focalisées sur l'impact des perturbateurs endocriniens sur la fonction de reproduction. Cependant, d'autres fonctions endocriniennes telles que la fonction thyroïdienne sont fondamentales pour le développement et le fonctionnement normal d'un individu. De plus, une perturbation de la fonction thyroïdienne peut également avoir des répercussions sur les fonctions reproductrices. L'incidence du cancer de la thyroïde a fortement augmenté ces deux dernières décennies en France : elle a notamment été multipliée par trois pour les femmes [3]. L'étude de l'impact des perturbateurs de la fonction thyroïdienne ou perturbateurs thyroïdiens est donc tout aussi fondamentale et nécessite le développement de nouveaux outils d'évaluation.

Dans un premier temps, les aspects historiques et les enjeux socio-économiques, sanitaires et scientifiques des perturbateurs thyroïdiens seront présentés. Les différentes possibilités d'interactions de certains perturbateurs thyroïdiens avec la fonction thyroïdienne seront décrites et les moyens d'études de ces substances seront discutés. Enfin, une

présentation du fipronil, substance chimique perturbatrice thyroïdienne potentielle choisie comme molécule modèle dans ce projet sera développée.

1. Les perturbateurs thyroïdiens

1.1 Historique

Bien que les effets néfastes de produits chimiques sur les systèmes endocriniens aient été suspectés depuis les années 1960, ce n'est qu'en 1996 aux Etats-Unis, et en 1999 en Europe que des stratégies d'étude des perturbateurs endocriniens ont été mises en place.

En Europe, la commission au Conseil et au Parlement européen a défini une liste de mesures :

- à court terme : établissement d'une liste prioritaire de substances en vue de leur évaluation, établissement de programmes de surveillance, identification de groupes plus vulnérables à certaines substances, information de la population, coordination des différents acteurs (Commission, Etats, industries...)

- à moyen terme : identification et évaluation des perturbateurs endocriniens, recherche de produits de substitution

- à long terme : prise en compte des perturbateurs endocriniens dans les mesures législatives notamment du règlement concernant l'évaluation des risques et la directive concernant la classification des substances dangereuses.

En 2005, la Commission européenne a adopté une proposition visant à instaurer une nouvelle politique en matière de substances chimiques. Le programme Enregistrement, Evaluation et Autorisation des Substances Chimiques (Registration Evaluation Autorisation of Chemicals : REACH) est un projet ayant pour ambition de contrôler les substances chimiques produites, importées et utilisées sur le territoire de l'Union Européenne. Ce programme comprend trois phases principales dont :

- une phase d'autorisation : les produits chimiques extrêmement préoccupants sont soumis à autorisation.

- une phase d'enregistrement : les producteurs et importateurs de produits chimiques doivent produire des informations et enregistrer toutes les substances dont la quantité produite dépasse une tonne par an.

- une phase d'évaluation : les autorités nationales compétentes examinent les dossiers d'enregistrement et peuvent faire la demande d'informations supplémentaires.

En France, un « Programme National de Recherche sur les Perturbateurs Endocriniens » a été lancé en 2005 par le Ministère de l'Ecologie, de l'Energie, du Développement durable et de l'Aménagement du territoire. Mon projet de thèse a d'ailleurs bénéficié d'un soutien financier dans le cadre de cet appel à projet.

1.2 Enjeux socio-économiques des perturbateurs thyroïdiens

Une grande partie des perturbateurs thyroïdiens potentiels se trouve dans la famille des polluants organiques persistants (POP). Cette famille regroupe des molécules aux propriétés insecticides et herbicides (hexachlorobenzène (HCB), DDT...), des retardateurs de flamme tels que les polybromobiphényles (PBB), les dioxines (polychlorodibenzo-p-dioxines (PCDD) et polychlorodibenzo-p-furanes (PCDF)) et d'autres produits chimiques dont les polychlorobiphényles (PCB), le pentachlorophénol (PCP) et le bisphénol A (BPA). La plupart des POP sont interdits depuis la Convention de Stockholm de 2004 mais leurs dérivés (PCDD et PCDF) sont encore produits [5]. De par leurs propriétés lipophiles, ces molécules sont très persistantes à la fois dans les organismes vivants et dans l'environnement. Ainsi, bien que la production et l'utilisation des PCB soient interdites depuis les années 1970, ils représentent les polluants les plus répandus et ils sont retrouvés à des concentrations 11 fois supérieures à la normale chez des sujets exposés accidentellement plus de 30 ans auparavant [6]. Les POP ont également tendance à s'accumuler dans les sédiments et dans les tissus végétaux et animaux, contaminant ainsi l'ensemble de la chaîne alimentaire jusqu'à l'homme.

Sur le plan économique, l'utilisation de produits chimiques, dont les plastifiants et les produits phytosanitaires occupent une place majeure, est aujourd'hui un facteur essentiel du développement de notre société et contribue à la prospérité économique que connaissent de nombreuses régions du monde. L'industrie chimique est le troisième secteur industriel en France avec un chiffre d'affaires global de 81 milliards d'euros en 2007. Le secteur regroupe environ 1200 entreprises de plus de 20 salariés pour un effectif d'environ 220 000 personnes en 2006 [7]. La chimie des matières plastiques représentait 8,7 % du chiffre d'affaires global en 2006 soit environ neuf milliards d'euros. En 2002, le marché phytosanitaire mondial représente 25 milliards de dollars et près de six milliards d'euros en Europe. En termes de quantité de produit utilisée par hectare en 2002, ce sont l'Italie, la France, les Pays-Bas et la Belgique qui apparaissent comme les plus gros consommateurs de pesticides. En 2007, 59 000 tonnes de produits phytosanitaires ont été vendues en France dont 85 % de fongicides et d'herbicides, représentant deux milliards d'euros [8].

1.3 Enjeux sanitaires des perturbateurs thyroïdiens

1.3.1 Troubles du développement

Les hormones thyroïdiennes (HT) jouent un rôle essentiel lors du développement du fœtus dans la prolifération neuronale, dans la migration et la différenciation cellulaires dans le cerveau [9]. Elles régulent également le développement de certains systèmes dopaminergiques et cholinergiques, importants pour la mémoire et l'apprentissage [10, 11].

Chez l'homme, le développement du fœtus dépend des HT maternelles jusqu'au second semestre de grossesse. La synthèse des HT par le fœtus débute à 10-12 semaines de grossesse et les concentrations des HT ne cessent alors d'augmenter tout au long de la grossesse [12]. L'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien n'est mature qu'à partir du troisième trimestre. Cependant, les HT maternelles, notamment la thyroxine (T4), semblent nécessaires jusqu'à la naissance, puisque 20 à 44 % de la T4 mesurée dans les quatre semaines après la naissance proviendraient de la mère [13]. Cette contribution maternelle serait essentielle au bon développement du cerveau du fœtus et pourrait expliquer l'incidence supérieure de divers problèmes de développement (repères spatiaux, perception, mémoire, langage) chez les enfants nés de mères à faibles niveaux de T4 libre (FT4) [14, 15].

Chez le rat, une perturbation de la fonction thyroïdienne pendant le développement entraîne l'augmentation d'apparition de troubles permanents des réflexes, de la motricité, de la mémoire et de l'apprentissage [16, 17]. Ainsi, les perturbateurs thyroïdiens pourraient avoir un impact très important durant le développement fœtal, surtout en ce qui concerne le développement du cerveau fœtal. Même à des doses non toxiques en aiguë, il est possible qu'une exposition même temporaire à de faibles doses de certains xénobiotiques puisse altérer le développement et le fonctionnement neurologiques futurs *via* une perturbation thyroïdienne modérée mais survenant à une période critique de développement.

L'exposition aux PCB, pouvant entraîner une perturbation thyroïdienne, conduit à des déficits d'apprentissage et de mémorisation chez le singe [18, 19] et le rat [20-22]. Elle est parfois associée à une augmentation de l'incidence d'altérations comportementales et cognitives chez l'enfant [23-25]. Cependant, la relation entre les troubles observés et l'exposition aux PCB et aux dioxines n'est pas toujours démontrée [26].

1.3.2 Carcinogénèse thyroïdienne

Chez l'homme, il existe deux principaux types de cancers thyroïdiens : le cancer papillaire, le plus couramment rencontré, et le cancer folliculaire. Un seul type de cancer est

présent chez les rongeurs et se rapprocherait plus du cancer folliculaire de l'homme. Une carcinogenèse thyroïdienne peut être engendrée soit par l'activité mutagène d'une substance, soit par la stimulation exacerbée et prolongée de la thyroïde par la thyroid-stimulating hormone (TSH), suite au déséquilibre de l'axe hypothalamo-hypophysio-thyroïdien provoqué par un xénobiotique [27]. Une action mutagène directe ne paraît pas être le mode de carcinogenèse thyroïdienne le plus répandu, car peu de substances présentent une activité mutagène spécifique à la thyroïde (^{131}I , ^{137}Cs). A l'inverse, de nombreux xénobiotiques sont connus comme étant des carcinogènes de la thyroïde chez les rongeurs en résultat d'une stimulation excessive de la thyroïde par la TSH suite à une perturbation de la fonction thyroïdienne. Toutefois, l'importance de ce mécanisme dans l'apparition de cancers thyroïdiens chez l'homme reste controversée. En effet, des sujets présentant des défauts de métabolisation des HT entraînant une exposition prolongée à des niveaux de TSH élevés, ne semblent pas prédisposés aux cancers thyroïdiens. Les études épidémiologiques chez des sujets souffrant de goitres endémiques ne montrent pas d'association entre les cancers thyroïdiens et une carence en iode alors que cette dernière induit un défaut de synthèse des HT, notamment de T4, et une augmentation de TSH stimulant la glande thyroïde [28]. De même, les résultats des études épidémiologiques sont discordants : certaines études suggèrent une augmentation de la mortalité par cancer thyroïdien chez des travailleurs exposés aux PCB [29] ou à un fongicide [30], alors que d'autres n'en ont pas mis en évidence [31, 32].

1.3.3 Perturbation thyroïdienne et fonction reproductrice

Les HT jouent un rôle dans le développement de l'appareil reproducteur : chez l'homme adulte, l'hypo ou l'hyperthyroïdie ont peu d'impact sur la fonction des gonades. En revanche, une hypothyroïdie prépubère peut entraîner une malformation des testicules. Les HT contrôlent la différenciation des cellules de Sertoli en agissant uniquement pendant les périodes périnatale et prépubère [33]. Chez la femme, l'hypothyroïdie prépubère est associée à des cycles menstruels perturbés (durée des cycles plus longue). Une hypothyroïdie sévère peut conduire à l'arrêt de l'ovulation. Une hypothyroïdie pendant la grossesse est souvent associée à des avortements, des enfants mort-nés ou des prématurés. L'hyperthyroïdie conduit également à des cycles menstruels altérés (durée et abondance des règles diminuées) et des niveaux accrus d'hormone lutéinisante et d'hormone folliculo-stimulante [34].

1.4 Enjeux scientifiques des perturbateurs thyroïdiens

Sur le plan scientifique, la problématique des perturbateurs endocriniens a permis de mettre en lumière les limites des connaissances acquises sur les différents systèmes endocriniens. L'étude de l'impact des perturbateurs endocriniens et de leurs mécanismes d'action sur les systèmes endocriniens a donc été l'occasion à la fois de répondre à des questions sociétales et sanitaires majeures mais également d'approfondir et revoir les fondamentaux de ces fonctions capitales des êtres vivants. De nombreuses avancées ont été entreprises sur les problématiques de reproduction/infertilité. Cependant, les autres systèmes endocriniens, dont la fonction thyroïdienne, n'ont pas suscité autant d'intérêt bien que les HT jouent un rôle fondamental dans le développement et le fonctionnement général des organismes. Un nouvel appel à projet du Ministère de l'Ecologie, de l'Energie, du Développement durable et de l'Aménagement du territoire a d'ailleurs été lancé mi-2008 ciblant des "questions orphelines", dont celle des impacts des perturbateurs endocriniens sur la fonction thyroïdienne ou le système immunitaire.

L'évaluation des risques des perturbateurs thyroïdiens ne prend généralement en compte que l'effet propre de chaque perturbateur thyroïdien, ce qui n'est pas représentatif des expositions humaines réelles. En effet, les pollutions diffuses et les nombreux usages des substances chimiques génèrent des expositions multiples, généralement à faibles doses. Peu d'études ont été réalisées sur l'impact des mélanges de perturbateurs thyroïdiens. Les seules données disponibles suggèrent qu'à mode d'action identique, l'additivité des doses des différentes substances pourrait raisonnablement prédire l'ampleur de la diminution des concentrations de T4. Cependant, ces études sont basées sur des mélanges de composés ayant les mêmes mécanismes d'action [35]. Gauger *et al.* [36] ont proposé une forme de coopération entre plusieurs PCB : le PCB 126 induirait les CYP1A1 qui métaboliseraient le PCB 105 et/ou le PCB 118 en composés agissant comme des agonistes des récepteurs des HT (TR). Ces résultats représentent un exemple révélateur de la problématique d'une exposition simultanée à des substances aux mécanismes d'action différents. Les interactions possibles entre les différentes substances (inhibition, addition, synergie des effets...) ne sont pas encore suffisamment connues.

2. Les mécanismes d'action des perturbateurs thyroïdiens

L'effet majeur de l'exposition aux PCB chez le rat adulte, le rat nouveau-né et la souris est la diminution des concentrations circulantes de T4 généralement sans diminution des concentrations de triiodothyronine (T3) [37-40]. Tout comme les PCB, le 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD), de la famille des dioxines, diminue les concentrations de T4 chez les rats adultes et nouveau-nés et peut augmenter les concentrations de TSH [41-43]. Dans des études réalisées chez les rongeurs, différents mélanges de PBDE et les PBB réduisent les niveaux circulants des HT [44, 45] et ce, aussi bien chez la mère que chez le fœtus [46]. Une diminution dose-dépendante de T3 et T4 a été montrée chez le rat exposé au di-*n*-butyl phtalate [47]. Une exposition prénatale au HCB chez des rats entraîne une diminution dose-dépendante des concentrations plasmatiques de T4 totale (TT4) et de FT4 à la fois chez les rates, les fœtus et les nouveau-nés [48, 49]. Le HCB est métabolisé en PCP qui provoque les mêmes effets que le HCB ; les effets du HCB sur la fonction thyroïdienne seraient d'ailleurs en grande partie dus à ses métabolites, dont le PCP [50]. Le phénobarbital, utilisé comme anticonvulsivant et sédatif, est un inducteur enzymatique hépatique des cytochromes P450 (CYP) chez l'homme et chez le rat. Dans les deux espèces, il peut conduire à une diminution de T4, moins fréquemment observée chez l'homme, mais qui n'est pas systématiquement accompagnée d'une augmentation de TSH [51-55]. La perturbation thyroïdienne chez les rats régresse lors d'une exposition prolongée, résultant de l'atteinte d'un nouvel état d'équilibre [52]. D'autres médicaments peuvent avoir un effet perturbateur thyroïdien parmi lesquels la rifampicine et certains anti-inflammatoires non stéroïdiens [56, 57].

Les mécanismes impliqués dans l'homéostasie thyroïdienne sont nombreux et complexes. Les perturbateurs thyroïdiens peuvent agir à tous les étages de l'axe hypothalamo-hypophysio-thyroïdien (Figure 1).

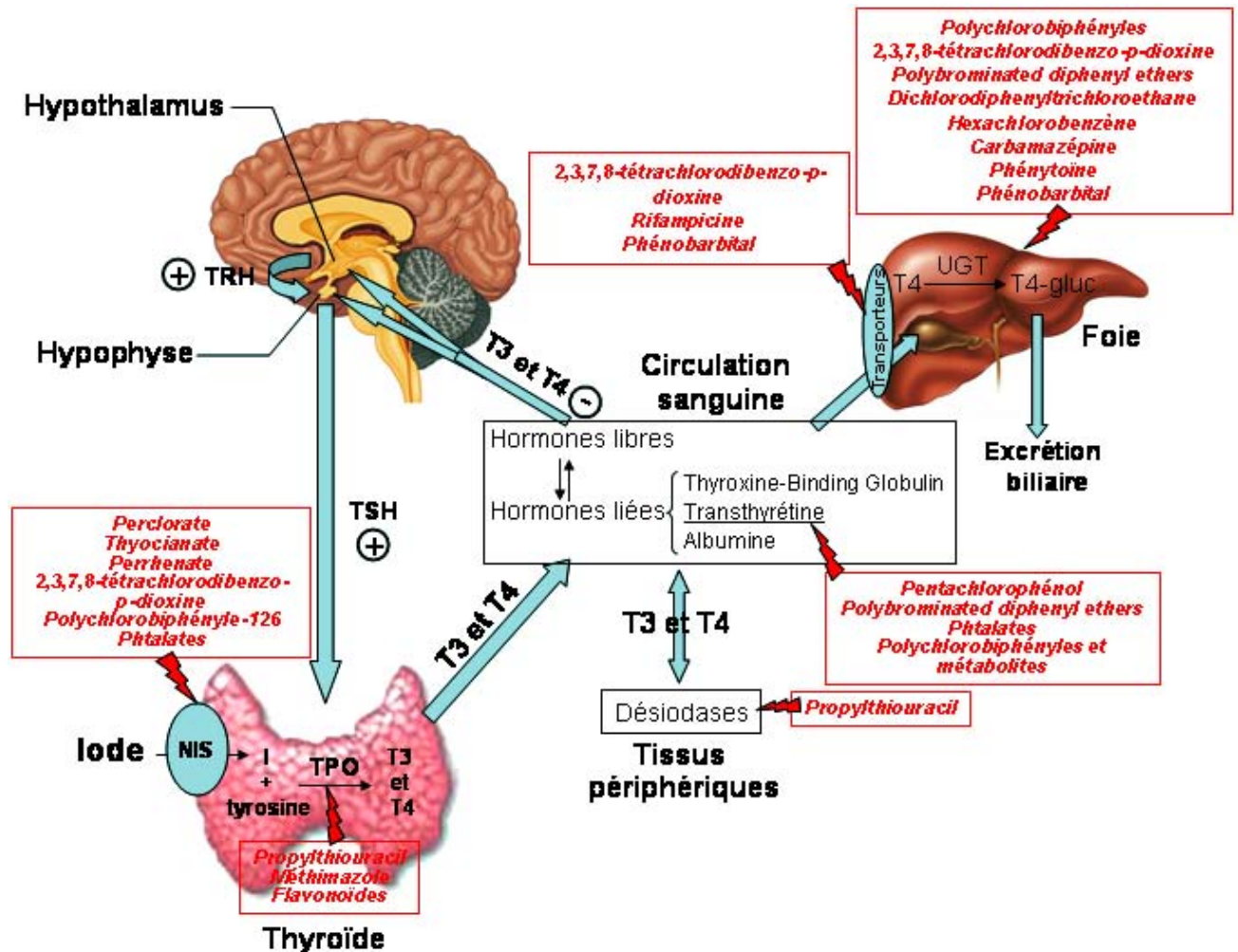


Figure 1 : Sites d'interaction potentiels de xénobiotiques sur la fonction thyroïdienne

La production des HT est contrôlée à l'étage hypothalamique par la sécrétion de thyrotropin releasing hormone qui stimule la production de thyroid stimulating hormone au niveau de l'hypophyse, elle-même stimulant la production des HT dans la thyroïde. Une fois libérées dans la circulation périphérique, les HT se trouvent quasi exclusivement sous forme liée à trois protéines plasmatiques de liaison : la thyroxine-binding globulin, la transthyréline et l'albumine. La forme libre des HT a une action biologique dans l'organisme et exerce un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de TRH et de TSH.

2.1 Effets directs sur la thyroïde

La synthèse des HT passe par la capture de l'iode, élément essentiel de la composition des HT. Cette étape réalisée par les cellules folliculaires de la glande thyroïde met en jeu un système de symporteur Na^+/I^- de la membrane, le natrium iodide symporter (NIS). L'activité et l'expression de ce transporteur sont stimulées par la TSH [58]. Un grand nombre de produits chimiques peuvent interagir directement sur la capture de l'iode. Le perchlorate (ClO_4^-), le thiocyanate (SCN^-) et le perrhenate (ReO_4^-) inhibent le NIS [59, 60]. De même le TCDD et le PCB-126 inhibent l'expression du NIS [61]. Au contraire, certains phtalates augmentent faiblement l'expression des ARN messagers (ARNm) et l'activité du NIS [62].

La thyroperoxydase (TPO) est une enzyme glycoprotéique qui oxyde les iodures et les incorpore dans les résidus tyrosine de la thyroglobuline en monoiodotyrosine (MIT) et diiodotyrosine (DIT). Elle couple également deux résidus DIT pour former la T4 principalement ou une MIT et une DIT pour former la T3. Des substances chimiques telles que le propylthiouracil (PTU) et le méthimazole, deux substances utilisées dans le traitement de l'hyperthyroïdie (Cooper 2005), mais également des substances d'origine naturelle telles que les flavonoïdes (pigments de coloration de nombreux végétaux) inhibent l'activité de la TPO [63].

2.2 Les protéines de transport

Une fois libérées dans la circulation générale, les HT sont essentiellement liées à des protéines plasmatiques. Les principales protéines de liaison des HT sont la Thyroxine-Binding Globulin (TBG), la transthyrétine (TTR) et l'albumine. D'autres protéines plasmatiques peuvent transporter les HT, comme des lipoprotéines, mais leur contribution au transport de ces hormones est limité [58].

2.2.1 La TBG

La TBG est une sialoglycoprotéine monomérique de 54kDa synthétisée par le foie. Chez l'homme, la concentration plasmatique de la TBG est faible (0.16 mg/mL) et elle présente un seul site de liaison spécifique aux HT. Cependant, elle transporte environ 80 % de la T3 et 70 % de la T4 circulantes ce qui fait d'elle la principale protéine de transport des HT chez l'homme [58]. Chez le rat, la TBG est exprimée au cours des périodes post-natale (jusqu'à huit semaines) et de sénescence (à partir de sept mois) mais est à peine détectable entre ces deux périodes [64]. La TTR est alors la principale protéine de transport des HT. Le même schéma d'expression a été décrit chez la souris [65]. La liaison de haute affinité des HT à la TBG pourrait influencer la proportion des HT sous forme libre, comme le suggèrent les fractions libres des HT supérieures chez le rat par rapport à l'homme et au mouton (tableau 1). Elle pourrait également jouer un rôle dans leur devenir dans l'organisme, comme le suggèrent les temps de demi-vie des HT inférieurs chez le rat par rapport à l'homme et au mouton (tableau 1) [66].

Chez des patients exprimant peu la TBG, les concentrations plasmatiques totales des HT sont diminuées (surtout pour la T4) alors que les concentrations des HT libres varient peu. De plus, la clairance des HT est augmentée (surtout pour la T4) alors que le taux de production diminue légèrement [67]. Les effets inverses sur les HT totales sont observés

chez des patients surexprimant la TBG, alors que les concentrations des HT libres restent relativement constantes [68-70].

Ces observations ont conduit au postulat selon lequel la TBG jouerait un rôle central dans la régulation du sort des HT notamment en protégeant les HT du catabolisme et de l'élimination hépatique. Les espèces n'exprimant pas la TBG tel que le rat et la souris adultes auraient une plus forte proportion de FT4 disponible pour ces deux mécanismes. Cela expliquerait entre autres les temps de demi-vie des HT supérieurs chez l'homme par rapport au rat [71]. Un autre rôle possible de la TBG est qu'elle constituerait un réservoir en T4 capable de compenser une perte transitoire de T4 [72, 73]. Les espèces dépourvues de TBG seraient donc plus sensibles aux perturbateurs thyroïdiens, notamment à ceux augmentant l'élimination des HT. Les perturbations thyroïdiennes par augmentation du catabolisme des HT observées chez le rat sont donc souvent considérées comme une particularité d'espèce. L'extrapolation à l'homme des résultats obtenus dans ce modèle est donc difficile et sujette à discussion car l'homme, et plus généralement les espèces exprimant la TBG, seraient moins sensibles à ce type de perturbation thyroïdienne. Cependant, ce rôle protecteur de la TBG face au catabolisme des HT reste encore aujourd'hui hypothétique. A l'heure actuelle, aucun modèle *in vivo* d'étude de la toxicité des perturbateurs thyroïdiens ne prend en compte cette différence interspécifique ce qui montre le besoin urgent d'un modèle *in vivo* plus pertinent pour l'homme pour évaluer l'effet de perturbateurs thyroïdiens.

Tableau 1 : Concentrations plasmatiques des HT libres et totales, fraction libre et temps de demi-vie des HT chez l'homme, le mouton et le rat

	Homme	Mouton	Rat
TT3 (ng/mL)	0.7 – 1.9	0.8 – 1.6	0.4
FT3 (pg/mL)	3.3	2.2 – 3.2	4
Fraction libre de T3	0.3 %	0.3 %	1 %
Temps de demi-vie de T3 (j)	0.75	1.1	0.25
TT4 (ng/mL)	78	52 - 56	29 - 38
FT4 (pg/mL)	30	9.9 – 11.2	24
Fraction libre de T4	0.04 %	0.02 %	0.07 %
Temps de demi-vie de T4 (j)	5 - 9	1.5	0.5

d'après [74, 75] pour le mouton ; [76, 77] pour le rat ; [58] pour l'homme.

2.2.2 La transthyrétine

La TTR est une protéine homotétramérique de 55kDa synthétisée par le foie et les plexus choroïdes. Elle possède deux sites de fixation des HT. Chez l'homme, la TTR transporte environ 10 à 20 % de T4 plasmatique, et la majorité de la T4 du liquide cébrospinal. Sa concentration plasmatique est environ 20 fois supérieure à celle de la TBG, sa contribution au transport des HT est cependant moins importante [78].

2.2.3 L'albumine

L'albumine est une protéine de 69 kDa synthétisée par le foie. Elle lie de façon non spécifique et non saturable un grand nombre de substances dont des hormones et des xénobiotiques possédant une région hydrophobe. La liaison des HT à l'albumine n'est pas spécifique. L'albumine a une faible affinité pour la T3 et la T4 mais sa forte concentration plasmatique explique qu'elle prenne en charge environ 10 % des HT (Tableau 2).

Tableau 2 : Caractéristiques des protéines de transport des HT chez l'homme, le mouton et le rat

	TBG	TTR	Albumine
	Concentration plasmatique chez l'homme (mg/mL)		
	0.16	2.5	40
	Constante de dissociation pour la T4 : Kd (nmol/L)		
Homme	0.105	6.25	2780
Mouton	0.112	7.14	2860
Rat	–	2.78	1540
	Capacité de liaison pour la T4 : Bmax (nmol/L)		
Homme	266.6	3230	51.3×10^6
Mouton	160	4494	35.2×10^6
Rat	–	3968	30.2×10^6
	Distribution de la T4 liée (%)		
Homme	73	19	8
Mouton	53	36	11
Rat	–	85	15

d'après [78]. La constante de dissociation, Kd, correspond à la concentration de T4 libre pour laquelle la moitié de la protéine de transport est saturée.

2.2.4 Perturbation thyroïdienne et protéines de transport

Certaines molécules chimiques possèdent une analogie structurale avec les HT et peuvent entrer en compétition au niveau des sites de liaison des protéines de transport. Ainsi, les PCB, certains retardateurs de flamme et phtalates se lient de manière compétitive à la TTR pouvant conduire à une diminution des concentrations des HT chez le rat [79]. De plus, les métabolites hydroxylés des PCB possèdent une affinité pour la TTR encore plus grande que la molécule mère et équivalente à celle de la T4 [80, 81]. Le PCP, métabolite du HCB, est un compétiteur plus affiné de la liaison à la TTR que le HCB [82, 83]. Cette compétition entre hormone endogène et métabolites hydroxylés des PCB, les PCDD et les PCDF ne se produirait pas vis-à-vis de la liaison à la TBG [84]. Cependant, étant donnée l'affinité de ces molécules pour la TTR, il reste à déterminer si, à des niveaux d'exposition constatés chez l'homme, elles peuvent significativement interférer avec le transport des hormones endogènes.

Les xénobiotiques liés à la TTR peuvent gagner, grâce à la TTR, la circulation et le cerveau du fœtus ; ils pourraient ainsi interagir avec le transport des HT vers le cerveau du fœtus [85]. Certains métabolites des PCB s'accumuleraient dans le fœtus *via* ce transport placentaire par la TTR tout en diminuant les concentrations de T4 à la fois chez la mère et le fœtus [86].

2.3 Les mécanismes de capture cellulaire des HT

Les HT sont transportées activement à travers la membrane cellulaire *via* des transporteurs membranaires spécifiques. Différentes familles de transporteurs ont été identifiées ces dernières années dont les transporteurs des acides aminés, les membres de la famille des Organic Anion-Transporting Polypeptide (OATP) et la famille des Monocarboxylate Transporter (MCT). Les transporteurs MCT8, MCT10 et OATP1C1 ont une forte spécificité vis-à-vis des HT. MCT8 est principalement exprimé dans le foie, le cœur et le placenta chez l'homme, dans le cœur et le cerveau chez le rat. Il joue un rôle important dans le développement du cerveau notamment en facilitant la capture de T3 par les neurones. Cela pourrait expliquer les retards mentaux et les problèmes importants de coordination et de langage (syndrome de Allan-Herndon-Dudley) chez les patients présentant une mutation de MCT8. MCT8 jouerait également un rôle dans l'efflux des HT [87]. L'OATP1C1, exprimé dans le cerveau humain et les plexus choroïdes, est notamment impliqué dans le transport de la T4 à travers la barrière hémato-encéphalique [88]. Les métabolites des HT peuvent également être pris en charge par des transporteurs spécifiques. C'est le cas du transporteur

OATP1B1 qui prend en charge le transport des sulfoconjugués des HT au niveau du foie [89].

Un certain nombre de produits chimiques, comme le butylbenzylphtalate, inhibe la capture cellulaire de [¹²⁵I]T3 [90] en modifiant entre autres l'expression des ARNm et la quantité d'OATP au niveau des hépatocytes [91, 92].

2.4 Les récepteurs aux HT

La T3 agit au niveau cellulaire par la liaison à un facteur de transcription nucléaire, le récepteur aux HT (TR). Ce récepteur lié à la T3 se dimérise avec un second récepteur et se lie à l'ADN sur un « Thyroid Response Element » pour initier l'expression génique. Les TR se dimérisent préférentiellement avec d'autres récepteurs, les « Retinoid X Receptors ». Il existe différentes isoformes de TR provenant de deux gènes différents : TR α 1, TR α 2, TR α 3, TR β 1 et TR β 2. Toutes les isoformes peuvent se lier aux HT à l'exception de TR α 2. La T3 a une affinité 50 fois supérieure à celle de la T4 pour chacun des TR. Les récepteurs sans ligand se lient aux « Thyroid Response Element » et jouent le rôle de répresseurs [93]. L'expression différentielle des isoformes en fonction des tissus serait à l'origine de l'action spécifique des HT.

Les xénobiotiques qui se retrouvent dans l'environnement peuvent altérer l'expression des gènes stimulés par les HT dans les cellules cibles. Cependant, le fait que cette action passe par une liaison directe des xénobiotiques aux TR reste controversé. Les PCB ne se lient pas directement aux TR malgré des effets similaires à la T3 [94, 95]. En revanche, leurs métabolites hydroxylés inhibent la liaison de T3 au TR et exercent également des effets similaires à la T3 [96]. Une étude de compétition de liaison de la T3 au TR β humain recombinant par des PCB, des PCB hydroxylés, du DDT et de ses métabolites a montré que seuls les PCB hydroxylés entraînent en compétition avec la T3. Cependant, l'affinité du récepteur pour ces molécules est 10 000 fois moindre que pour la T3 [81]. A l'inverse, le BPA pourrait se lier aux récepteurs des HT et agirait comme un antagoniste [97].

2.5 Le métabolisme des HT

2.5.1 Les désiodases

Les désiodases périphériques sont des sélénoenzymes qui contrôlent la conversion des HT dans différents organes et sont essentielles dans la régulation des concentrations de T3. Environ 80 % et 60 % de la production de T3 respectivement chez l'homme et le rat, se fait par désiodation de la T4 par l'intermédiaire des désiodases [98]. Il existe trois types de désiodases : la désiodase de type I, exprimée principalement dans le foie et les reins ; elle

transforme la T4 en T3 ou en reverse T3 (rT3, biologiquement inactive) ainsi que les métabolites sulfoconjugués (voir plus loin). La désiodase de type II, principalement située dans le système nerveux central, les tissus adipeux et le placenta, est la principale source de formation de T3 à partir de la T4. La désiodase de type III inactive les HT en 3, 3' diiodothyronine ou en rT3 dans le cerveau, la peau, le placenta et le fœtus; elle serait la principale voie d'élimination de la T3. Le type et la quantité de désiodases varient suivant les tissus, l'âge, l'espèce, le régime alimentaire et le statut hormonal [99]. Les HT, notamment la T3, contrôlent l'expression des désiodases.

La désiodase de type I est inhibée par le PTU. L'activité de la désiodase II est augmentée dans le cerveau des fœtus et nouveau-nés exposés au HCB [48].

2.5.2 Les enzymes de phase II : uridine diphospho-glucuronosyltransférases (UDPGT) et sulfotransférases

La glucuronoconjugaison des HT, réalisée par des enzymes microsomales hépatiques, facilite leur excrétion biliaire et représente une voie importante de métabolisation des HT chez le rat. Chez cette espèce, 25 % d'une dose de T4 administrée par voie orale est excrétée dans la bile en 24 h dont plus de 50 % sous forme glucuronidée [100]. La glucuronoconjugaison de la T3 serait quantitativement moins importante que celle de la T4 chez le rat et serait une voie métabolique mineure chez l'homme [101].

De nombreux produits chimiques augmentent l'élimination des HT, notamment de la T4, par voie biliaire. Le mélange de PCB Aroclor 1254, le pregnenolone-16alpha-carbonitrile, le phénobarbital et le 3-methylcholanthrene induisent l'expression des UDPGT conduisant à une diminution dose-dépendante des concentrations de TT4 et FT4 ; mais seuls le phénobarbital et le pregnenolone-16alpha-carbonitrile augmentent la glucuronoconjugaison de T3 ainsi que les concentrations de TSH [102]. De même le TCDD et certains PBDE diminuent les concentrations de TT4 par induction des UDPGT chez le rat [46, 103, 104]. Des effets similaires ont été démontrés pour le DDT [105] et le HCB [48].

Le phénobarbital est un faible inducteur des UDPGT chez l'homme contrairement au rat. La relation entre l'induction dose-dépendante des UDPGT par le phénobarbital et l'augmentation de l'élimination de la T4 chez le rat n'a pas toujours pu être mise en évidence [55, 106]. Récemment, il a même été montré que la diminution des concentrations de T4 induite par le phénobarbital pouvait se produire indépendamment de l'induction des UDPGT [107].

La carbamazépine et la phénytoïne sont des inducteurs des UDPGT chez l'homme, pouvant expliquer la diminution de FT4 et TT4 fréquemment observée lors de l'exposition à ces substances [108, 109].

Une autre voie de métabolisation facilite l'excrétion de composés: la sulfoconjugaison. Cette réaction se fait principalement dans le foie. Les HT préalablement sulfoconjuguées sont plus facilement désiodées par la suite notamment par la désiodase de type I. L'importance de cette voie métabolique est difficile à estimer.

Des stéroïdes sexuels (œstrogène, progestérone) et des glucocorticoïdes exogènes (dexaméthasone) augmentent l'activité des sulfotransférases [110]. Au contraire, de nombreux xénobiotiques (PCP, certains PCB et leurs métabolites, le triclosan) inhibent leur expression et leur activité mais l'impact de cet effet sur les concentrations des HT circulantes reste inconnu [111].

La pertinence de l'ensemble de ces résultats expérimentaux sur la population humaine est plus nuancée lorsque l'on considère les résultats des études épidémiologiques. Certaines études ont pu montrer une association entre certains perturbateurs thyroïdiens potentiels et des changements de concentrations des HT.

La phénytoïne et la carbamazépine sont des anticonvulsivants provoquant une diminution de FT4 et TT4 parfois accompagnée d'une diminution de T3 totale (TT3). Cependant, ces altérations des concentrations des HT sont rarement accompagnées d'une modification des concentrations de TSH [54, 100, 112]. En revanche, une exposition prolongée au HCB a été associée à une diminution significative des concentrations des HT libres et une augmentation des concentrations de TSH [113].

Les effets de certains perturbateurs thyroïdiens potentiels sont sujets à controverse. Des études épidémiologiques aux résultats discordants ont été réalisées sur des populations humaines habitant des régions fortement polluées par les PCB. Certaines d'entre elles ont montré une corrélation négative entre les concentrations sanguines de PCB et les concentrations des HT accompagnée ou non [114, 115] par une corrélation positive entre l'exposition aux PCB et les concentrations de TSH [116]. D'autres n'ont mis en évidence aucune association entre PCB et HT [117, 118]. De même pour les dioxines, l'association entre une altération des concentrations des HT et l'exposition aux dioxines reste controversée [119, 120]. Les études sur les effets des retardateurs de flamme sur la fonction thyroïdienne chez l'homme n'ont montré aucune corrélation entre les concentrations de polybrominated diphenyl ethers (PBDE) et celles des HT [121, 122]. Une corrélation négative

entre l'exposition au PCP (*via* le régime alimentaire riche en poissons contaminés des mères) et la FT4 a été détectée chez les nouveau-nés [123]. Toutefois, les effets des pesticides organochlorés sur la fonction thyroïdienne chez l'homme n'ont pas toujours été retrouvés [124].

Ces études montrent la nécessité d'un modèle d'étude ciblé permettant de confirmer ou d'infirmer les liens mis en évidence par les études épidémiologiques et de déterminer les mécanismes d'action sur la fonction thyroïdienne des perturbateurs identifiés.

3. Les modèles d'études des perturbateurs thyroïdiens

3.1 Les tests *in vitro*

De nombreux tests *in vitro* ont été développés ces dernières années afin d'évaluer l'effet des produits chimiques sur les mécanismes fondamentaux de la fonction thyroïdienne. Par exemple, l'effet de certaines molécules sur la capture de l'iode peut être analysé dans des cellules non transformées de thyrocytes de rat appelées FRTL-5 (Fischer rat thyroid cell line). Dans ce modèle, des expositions à divers phtalates ont induit une augmentation ou une diminution de capture de l'iode par le NIS après un à deux cycles cellulaires [62].

Les activités enzymatiques des principales enzymes responsables du métabolisme des HT peuvent être mesurées *in vitro* ou *ex vivo* telle que l'activité de la TPO, des désiodases et des UDPGT. De nombreuses études de liaison des xénobiotiques aux protéines de transport ont également été réalisées. Récemment, des systèmes dans lesquels un gène de TR transfecté dans une lignée cellulaire ou dans *Escherichia coli* avec un gène rapporteur de type luciférase ont été développés afin de déterminer si un xénobiotique pouvait avoir un effet hormono-mimétique. Un autre modèle utilisant une lignée cellulaire de tumeur hypophysaire de rat, appelée GH3, permet de détecter d'éventuels agonistes des récepteurs aux HT, la croissance et la morphologie de ces cellules étant dépendantes des HT [125].

L'avantage principal de ces tests est qu'ils donnent une information mécanistique précise permettant de cibler les futures recherches. Cependant, ces tests présentent deux limites principales : ils sont restreints à un seul mécanisme spécifique qui ne reflète pas les modes d'action *in vivo*, ni les interactions complexes mises en jeu dans un organisme entier. De plus, les aspects cinétiques/métaboliques (absorption, distribution, métabolisation et excrétion) ne sont pas pris en compte. Les réactions de métabolisation d'un xénobiotique sont propres à ces systèmes et ne sont pas forcément révélatrices de celles mises en jeu lors de l'exposition d'un organisme entier. Il n'y a donc pas forcément, entre autres, la possibilité d'observer les effets d'une éventuelle activation/inactivation métabolique de la substance

testée. Les résultats *in vitro* sont donc principalement dédiés à comprendre et documenter les mécanismes d'action de substances déjà identifiées comme perturbateurs thyroïdiens.

3.2 Les modèles animaux d'étude des perturbateurs thyroïdiens

Les modèles animaux présentent de nombreux avantages par rapport aux tests *in vitro*. Les phases d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'élimination des perturbateurs thyroïdiens sont présentes et permettent d'observer leurs effets intégrés sur la fonction thyroïdienne. Il y a donc moins de risques de faux négatifs (si ce sont le/les métabolite(s) qui sont actifs) ou de faux positifs (le site d'action chez l'individu n'est pas exposé à la substance active car elle est métabolisée rapidement ou elle ne peut accéder au site d'action) que lors de l'utilisation de modèles *in vitro*. Tous les organes impliqués dans les différents systèmes endocriniens étant présents et fonctionnels, la toxicité générale de la molécule peut être testée et les effets sur les concentrations d'hormones circulantes peuvent être mesurés. Cependant, le mécanisme d'action détaillé d'une substance est difficile à déterminer *in vivo* car l'identification de l'origine des effets observés et la détermination des liens de cause à effet sont parfois complexes voire impossibles à élucider. De plus, l'évaluation toxicologique *in vivo* des produits chimiques à grande échelle est irréalisable à la fois matériellement et du point de vue éthique.

3.2.1 Les rongeurs

Le rat est le modèle expérimental le plus utilisé pour tester la toxicité des produits chimiques. L'incidence des malformations spontanées est moins importante que chez la souris ou le lapin, deux autres espèces couramment utilisées en laboratoire [66].

La toxicité de plus de 80 000 substances chimiques doit être analysée. Pour faire face à cette tâche colossale, divers organismes tel que l'Environmental Protection Agency (EPA) ou l'Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) ont défini des protocoles d'études validés et standardisés afin de pouvoir comparer les résultats établis dans les différents laboratoires. Parmi les différents protocoles standardisés de criblage *in vivo* des substances potentiellement perturbatrices endocriniennes, l'accent est mis sur la détection des perturbations des hormones sexuelles, de la différenciation sexuelle et de l'appareil reproducteur. Aucun test n'est réellement dédié à la détection des perturbateurs thyroïdiens. L'OECD a défini un protocole, TG 407, pour identifier le profil toxicologique de produits chimiques sur des fonctions endocrines après une période d'exposition de 28 jours.

Ce test est reconnu au niveau international par plusieurs agences réglementaires notamment en Europe et au Japon. Ce protocole initialement focalisé sur la fonction de reproduction a été amélioré et inclut maintenant des investigations sur la fonction thyroïdienne telles que l'évaluation des effets des substances sur le poids et la structure histologique de la thyroïde ainsi que la mesure des concentrations des HT.

Bien que les mécanismes fondamentaux de la fonction et de la régulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien soient qualitativement similaires entre le rat et l'homme, il existe des différences interspécifiques importantes à prendre en compte.

La principale protéine responsable du transport des HT chez l'homme, la TBG, est pratiquement indétectable chez le rat adulte. Chez l'homme, le temps de demi-vie des HT est supérieur à celui du rat adulte (tableau 1). Cette différence interspécifique n'est pas encore complètement comprise mais l'absence de protéine de liaison de haute affinité chez le rat conduirait à une plus forte proportion de T4 disponible pour le métabolisme et l'élimination. Cette élimination plus rapide des HT résulte en un taux de production élevé des HT afin de maintenir les concentrations plasmatiques. Ainsi, le taux de production des HT est supérieur chez le rat : un rat sans glande thyroïde fonctionnelle nécessite 10 fois plus de T4 qu'un homme pour restaurer des concentrations physiologiques de T4 [126]. La morphologie des cellules folliculaires thyroïdiennes reflète une activité fonctionnelle plus importante chez les rats.

Par ailleurs, la voie d'élimination biliaire est moins importante chez l'homme que chez le rat alors qu'elle est souvent sollicitée chez le rat lors d'une exposition à un xénobiotique [127].

Enfin, le rat est plus sensible aux cancers de la thyroïde induits par stimulation de la TSH que l'homme et les types de cancers thyroïdiens diffèrent entre les deux espèces (majoritairement papillaire chez l'homme, exclusivement folliculaire chez le rat).

Certaines lignées de souris présentant des mutations spontanées ont permis d'obtenir des informations sur le rôle des HT dans le développement du cerveau. La souris est un modèle intéressant car il est possible de créer des modèles transgéniques. Ainsi, des modèles de souris transgéniques portant des mutations observées chez l'homme ont permis de comprendre les mécanismes génétiques à l'origine des cancers thyroïdiens chez l'homme. De plus, les souris B6C3F1 chez lesquelles l'apparition spontanée de tumeurs survient dans 1 à 10 % des femelles et 0.8 % des mâles à deux ans sont couramment utilisées dans les

études de toxicité à long terme [128]. Cependant, comme le rat, la souris n'exprime pas la TBG à l'âge adulte [65].

3.2.2 *Xenopus laevis*

Xenopus laevis est un crapaud originaire d'Afrique. Un test sur cet amphibien basé sur la métamorphose T3-dépendante des têtards (XEMA) a été développé et est en cours de validation. En effet, la métamorphose de *X. laevis* est un processus complexe qui entraîne la transformation de la larve en un tétrapode adulte en présence de concentrations croissantes d'HT. Dans ce modèle, le méthimazole et le PTU provoquent un retard du développement de la larve et des altérations de la morphologie de la glande thyroïde concentration-dépendants [129]. Ainsi, de nombreux paramètres comme la résorption de la queue, l'émergence des membres, les altérations histologiques de la glande thyroïde et l'expression de TSH permettent de détecter un perturbateur thyroïdien potentiel [130]. Ce modèle est cependant encore peu utilisé et présente certaines limites. D'autres hormones (prolactine, corticostérone, aldostérone...) sont impliquées dans les différentes étapes de métamorphose des têtards [131]. Les substances chimiques perturbant la métamorphose pourraient donc agir par d'autres systèmes endocriniens. De plus, la validité de ce modèle n'a pour l'instant été testée que pour des substances inhibant la synthèse des HT. Récemment, un modèle de Xénope transgénique contenant la séquence codant pour la protéine GFP (Green Fluorescent Protein) sous le contrôle d'un « Thyroid Response Element » a été développé. Ce modèle permet d'identifier les xénobiotiques ayant une action similaire à la T3 ou qui au contraire inhibent son action (*via* la régulation de la désiodation de T3 ou par inhibition de sa synthèse) [132].

3.2.3 *Le mouton*

Le singe, le cheval, le chien, le porc, les bovins, la chèvre et les ovins font partie des espèces exprimant la TBG [126, 133]. La TBG est la principale protéine de transport des HT chez le mouton et chez l'homme. De plus, elle possède des caractéristiques de liaison aux HT similaires telles que l'affinité pour les HT et le Bmax (capacité maximale de liaison des HT à la TBG) (tableau 2) contrairement aux autres espèces domestiques précédemment citées. Cette similarité peut être étendue aux autres protéines plasmatiques de liaison des HT, la TTR et l'albumine [78, 134]. Enfin, les concentrations plasmatiques des HT sont relativement similaires entre l'homme et le mouton (tableau 1). Ce modèle, présentant moins de

contraintes que le singe, pourrait être un modèle approprié d'étude de perturbateurs thyroïdiens potentiels pour l'homme.

4. Le fipronil

4.1 Historique, législation et mode d'action

4.1.1 Historique et législation

Le fipronil est une substance chimique insecticide dont la mise sur le marché est autorisée depuis 1994 pour lutter entre autres contre les ravageurs de cultures, les cafards, les fourmis ainsi que contre les puces et tiques d'animaux de compagnie. Il entre dans la composition de nombreuses préparations phytosanitaires pour l'agriculture ou les jardiniers amateurs, dans certains médicaments vétérinaires (*Frontline*[®] commercialisé par Merial, par exemple) ou dans des biocides à usage domestique ou professionnel. Le fipronil est l'antiparasitaire externe vétérinaire le plus vendu au monde. Depuis son lancement, il a été homologué dans 120 pays. En 1997, la production annuelle était d'environ 480 tonnes et prévoyait d'être de 800 tonnes d'ici l'an 2000. En 2004, il détenait 80 % du marché des antiparasitaires externes vétérinaires en France : la quantité de fipronil mise sur le marché pour cet usage était alors de 2 310 kg.

Sur le plan de la réglementation des produits phytosanitaires, le fipronil est autorisé dans la composition de préparations bénéficiant d'une autorisation de mise sur le marché. Cependant, il a fait l'objet d'importantes restrictions d'emploi pour son utilisation en protection des cultures en France. En février 2004, le gouvernement français a suspendu l'autorisation d'emploi de plusieurs préparations phytosanitaires contenant du fipronil dont le *Régent*[®] du fait de sa possible implication dans la mortalité des abeilles. Il a fait l'objet d'une évaluation communautaire, qui s'est conclue, en août 2007, par son inscription à l'annexe I de la directive 91/414/CEE des substances actives autorisées dans la composition des produits phytopharmaceutiques en tant qu'insecticide destiné au traitement des semences.

4.1.2 Mode d'action insecticide du fipronil

Le fipronil fait partie de la famille des phénylpyrazoles. La cible du fipronil est le récepteur GABA (acide γ -amino-butérique) des invertébrés. Il agit comme inhibiteur non compétitif de ce récepteur. Ainsi, il bloque les canaux chlorures en partie en diminuant leur fréquence d'ouverture, ce qui supprime les courants induits par le GABA, le neurotransmetteur inhibiteur majeur dans le système nerveux central [135]. Les récepteurs GABA des invertébrés seraient relativement proches des récepteurs GABA_A présents chez

l'homme [136]. Cependant, le fipronil possède une affinité supérieure pour les récepteurs GABA des invertébrés que pour ceux des mammifères ; cette propriété lui confère ainsi sa sécurité d'utilisation [137]. Le récepteur GABA_A est un pentamère composé de combinaisons de différentes sous-unités : six sous-unités α , quatre sous-unités β , trois sous-unités γ et une sous-unité δ [138]. La sélectivité du fipronil pour les récepteurs GABA serait conditionnée par la composition en sous-unités des récepteurs GABA [139, 140].

Le fipronil aurait également pour cible des récepteurs au glutamate qui contrôlent l'ouverture des canaux chlorures et bloquerait l'ouverture de ces canaux. Ces récepteurs n'étant présents que chez les invertébrés, cette propriété supplémentaire du fipronil expliquerait sa grande spécificité d'action vis-à-vis des invertébrés [141, 142].

4.2 Métabolisme et toxicologie

Les deux métabolites principaux du fipronil sont le fipronil désulfinyl et le fipronil sulfone (figure 3). Ce dernier est le métabolite principal du fipronil chez l'homme et le rat [143], obtenu par sulfoxydation du groupement thioéther du fipronil. Le fipronil désulfinyl étant le résultat de la photodégradation du fipronil, il est essentiellement retrouvé dans l'environnement [144]. Ces deux composés sont moins sélectifs pour les récepteurs GABA que le fipronil [144, 145]. En ce qui concerne les récepteurs au glutamate, le fipronil sulfone est plus puissant que le fipronil pour bloquer l'ouverture des canaux chlorures de ces récepteurs [146].

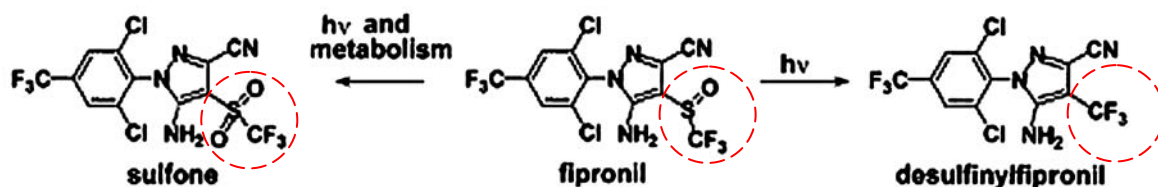


Figure 2 : Le fipronil et ses principaux métabolites

Le fipronil peut être principalement photodégradé en dérivé désulfinyl ; il peut également être oxydé par l'action de la lumière ou dans un organisme en dérivé sulfoné.

Le métabolisme du fipronil se fait principalement par le CYP3A4 chez l'homme. Le CYP3A4 est l'isoforme prédominante des CYP et il est responsable de la sulfoxydation du fipronil en fipronil sulfone chez l'homme, et nécessite la co-expression du cytochrome b5. Le fipronil peut donc interagir et entrer en compétition avec d'autres substrats du CYP3A4, provoquant une diminution du métabolisme et de l'élimination de ces substrats, comme c'est le cas pour le diazépam et la testostérone. Les constantes de Michaelis-Menten du fipronil, Km, pour les microsomes hépatiques sont identiques chez l'homme et le rat, cependant, sa

vitesse maximale d'élimination, V_{max} , est supérieure chez le rat. Cela indique que la clairance du fipronil chez le rat pourrait être plus importante que chez l'homme [143].

Les données pharmacocinétiques (PK) sont sommaires. En effet, des études PK du fipronil réalisées chez le rat ont été faites avec du fipronil radiomarké au carbone 14 : les données PK obtenues ne distinguent donc pas les propriétés PK propres du fipronil de celles de ses métabolites. Ainsi, le temps de demi-vie de l'ensemble des produits radiomarkés suite à une administration unique par voie orale de fipronil radiomarké serait relativement long, environ 175 h. L'élimination se fait principalement dans les fèces (50 % de la dose). Quelle que soit la dose, le fipronil et ses métabolites se retrouvent principalement dans la graisse puis dans une moindre mesure dans les surrénales, le pancréas, la thyroïde et les ovaires.

La toxicité aiguë du fipronil est relativement faible, la dose létale 50 étant de 97 mg/kg chez le rat. Les principaux signes cliniques lors de ces essais sont des troubles neurologiques (tremblements, convulsions, piloérection, posture voûtée). Des essais de toxicité à moyen terme chez le rat montrent principalement des effets sur le foie et la thyroïde (augmentation de la masse et hypertrophie) [147].

En ce qui concerne l'exposition humaine, la voie principale de contamination est la voie orale. La Dose Journalière Admissible est de 0,2 µg/kg/j. Le fipronil augmente l'expression et l'activité des CYP3A4 et 1A1 d'hépatocytes humains isolés. Le fipronil et le fipronil sulfone ont également des propriétés cytotoxiques vis-à-vis des hépatocytes humains [148]. Cependant, malgré une atteinte hépatique observée dans les essais de toxicité à moyen terme (augmentation de la masse du foie, hypertrophie avec dégénérescence des hépatocytes), les données toxicologiques du fipronil sur les activités microsomales hépatiques de rats, de souris et de lapins traités au fipronil (1.2 ou 5 mg/kg/j pendant 4 ou 14 jours) sont peu concluantes [147].

4.3 Toxicologie endocrinienne

L'application de la spécialité Frontline (Merial) à 10 % de fipronil sur la peau de rates Wistar a entraîné un allongement des œstrus et une diminution du nombre de gestations à la plus forte dose (280 mg/kg). Les concentrations d'œstradiol ont été diminuées et celles de progestérone augmentées au quatrième jour d'une application unique de fipronil à 70 mg/kg [149].

Par ailleurs, une étude toxicologique à long terme (91 semaines) chez le rat a montré qu'une exposition orale au fipronil était associée à une augmentation de l'incidence des tumeurs de la thyroïde chez le rat mâle et femelle à des doses respectives de 13 mg/kg/j et

17 mg/kg/j. Le fipronil ne posséderait pas d'activité mutagène qui pourrait expliquer ces tumeurs thyroïdiennes mais il induirait un déséquilibre hormonal à l'origine de l'apparition de ces tumeurs, caractérisé par une diminution des concentrations plasmatiques de T4 (observée à partir de 0.078 mg/kg/j après sept jours de traitement) et une augmentation des concentrations de TSH (observée à 13 mg/kg/j après sept jours de traitement) [150]. En revanche, le niveau de T3 circulant ne serait pas modifié. Ces effets sur les concentrations de T4 et TSH seraient réversibles dès la deuxième semaine suivant l'arrêt du traitement. Le fipronil (10 mg/kg/j pendant 14 j, *per os* (PO)) augmente la clairance plasmatique et biliaire de la T4, tendant à montrer qu'il serait un activateur du catabolisme de la T4 [150]. Le fipronil augmenterait également la capture d'iode dans la thyroïde ainsi que l'activité de la TPO [71].

Le fipronil est donc identifié comme un perturbateur thyroïdien chez le rat. Il provoquerait un déséquilibre de la fonction thyroïdienne en augmentant l'élimination de la T4 dans cette espèce. Il représente donc une molécule modèle adéquate pour tester le rôle protecteur de la TBG face à une augmentation de l'élimination des HT. De plus, en raison de sa large utilisation tant dans le secteur professionnel (agriculteurs, vétérinaires, techniciens de production) que dans des applications domestiques (produits vétérinaires ou anti-nuisibles), il peut être considéré comme une source potentiellement importante de contamination de la population [147, 151] et représente donc une molécule d'intérêt majeur pour l'étude de l'impact sur la population humaine d'un perturbateur thyroïdien potentiel.

5. Problématique et objectifs de la thèse

Une des hypothèses communément admise sur le rôle de la TBG est qu'elle jouerait un rôle central dans la régulation du métabolisme des HT notamment en les préservant du métabolisme et de l'élimination. Elle constituerait également un réservoir en T4 capable de compenser une perte transitoire de T4 [72, 73]. Les espèces dépourvues de TBG seraient donc plus sensibles aux perturbateurs thyroïdiens, notamment à ceux augmentant l'élimination des HT. Les perturbations thyroïdiennes par augmentation du catabolisme des HT observées chez le rat sont donc souvent considérées comme spécifiques de l'espèce. L'extrapolation à l'homme des résultats obtenus dans ce modèle est donc difficile et sujette à discussion car l'homme, et plus généralement les espèces exprimant la TBG, seraient moins sensibles à ce type de perturbation thyroïdienne. Cependant, ce rôle protecteur de la TBG face au catabolisme des HT reste encore aujourd'hui hypothétique. A l'heure actuelle, aucun modèle d'étude de la toxicité des perturbateurs thyroïdiens ne prend en compte cette

différence interspécifique ce qui montre le besoin urgent d'un modèle plus pertinent pour évaluer la toxicité de perturbateurs thyroïdiens potentiels pour l'homme.

Comme évoqué précédemment, le fipronil perturbe l'homéostasie de la fonction thyroïdienne chez le rat par augmentation du catabolisme de la T4 et est largement utilisé par la population humaine ce qui en fait une molécule test appropriée pour étudier l'impact d'un perturbateur thyroïdien potentiel sur la population humaine.

L'objectif général de la thèse a donc été de réévaluer la toxicité du fipronil pour la fonction thyroïdienne dans un modèle plus pertinent pour l'homme vis-à-vis des protéines de transport des HT et de déterminer si la TBG, principale protéine de transport des HT chez l'homme, aurait un rôle protecteur de l'homéostasie de la fonction thyroïdienne, notamment lors de l'augmentation de l'élimination des HT. Pour cela, nous avons choisi comme modèle expérimental une espèce dont la fonction thyroïdienne était proche de celle de l'homme, notamment en termes de protéines plasmatiques de transport des HT : le mouton. Ce travail repose sur la comparaison des effets du fipronil sur la fonction thyroïdienne entre l'espèce de référence utilisée dans les études toxicologiques, le rat, et notre modèle jugé plus représentatif de la fonction thyroïdienne de l'homme, le mouton.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé la perturbation thyroïdienne et avons documenté le schéma physiopathologique chez le rat, espèce de référence sensible aux effets perturbateurs thyroïdiens du fipronil. Dans ce modèle, nous avons également caractérisé l'exposition des animaux au fipronil et au fipronil sulfone en termes de concentrations plasmatiques afin de pouvoir extrapoler à l'homme les données toxicologiques observées chez le rat et le mouton.

Nous avons ensuite évalué la toxicité du fipronil sur la fonction thyroïdienne dans un modèle animal exprimant la TBG : le mouton. Un éventuel effet du fipronil sur les concentrations plasmatiques des HT et de TSH a été testé sur des béliers à thyroïde intacte. L'effet du fipronil sur l'élimination de la T4 a ensuite été étudié pour déterminer si le fipronil avait les mêmes capacités d'augmentation du catabolisme de la T4 que chez le rat. Son effet sur les activités des enzymes hépatiques de phase I, notamment les CYP, a également été évalué.

Enfin, nous avons étudié la possibilité d'autres sites d'interaction du fipronil ou du fipronil sulfone avec l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien dans l'espèce sensible, le rat. Pour cela, nous avons utilisé une approche globale sans hypothèse *a priori* en procédant à une analyse transcriptomique de deux organes clé de la fonction thyroïdienne : l'hypophyse et la thyroïde.

*MATERIELS ET METHODES
COMMUNS AUX DIFFERENTES
ETUDES EXPERIMENTALES*

Animaux - chirurgie - prélèvements sanguins

Toutes les expériences ont été réalisées conformément aux standards (agrément 31-242) de l'expérimentation animale du Ministère de l'Agriculture.

5.1 Expériences réalisées sur les rats

Toutes les expériences faites chez le rat ont été réalisées avec des rats femelle Wistar d'environ neuf semaines (poids corporel : 250 g) achetées chez Janvier (Le Genest Saint Isle, France) ou Charles River (L'Arbresle, France). Les rats étaient logés à deux ou trois par cage à température ambiante avec un cycle lumineux inversé de 12 heures (lumières éteintes à 10 h du matin) et sont restés en période d'acclimatation au moins deux semaines avant le début des expériences. Les animaux avaient libre accès à l'eau et à l'aliment (Harlan, T2016, Gannat, France) et ils étaient pesés deux fois par semaine.

Les prélèvements sanguins ont été collectés *via* un cathéter inséré dans la veine fémorale gauche. La mise en place du cathéter a été réalisée sous anesthésie générale (kétamine/médétomidine : Imalgène® 1000, Merial SAS, Villeurbanne, France / Domitor®, Pfizer, Paris, France, 50 mg/kg et 0.2 mg/kg) au moins trois jours avant les cinétiques. Lorsque les rats ont été thyroïdectomisés (THX), la thyroïdectomie et la cathétérisation ont été réalisées en même temps une semaine avant le début du traitement au fipronil. Pendant la période post opératoire, les rats THX ont reçu des injections quotidiennes de lactate de Ringer (5 mL/j, SC, B Braun Medical, Boulogne, France) pendant une semaine ainsi qu'un traitement anti-infectieux au sulfadoxine (7.5 mg/kg/j) et triméthoprime (1.5 mg/kg/j) (Borgal®, Intervet S.A., Angers, France) pendant deux jours.

Après chaque prélèvement sanguin, un volume de sérum physiologique équivalent au volume de sang collecté était administré, suivi de 200 µL de sérum physiologique hépariné à 50 UI/mL. Les prélèvements sanguins ont été centrifugés à 3000 g pendant 15 min à 4 °C et les échantillons de plasma ont été stockés à -20 °C jusqu'aux dosages. Les concentrations de fipronil et fipronil sulfone ont été déterminées dans les échantillons collectés environ 25 h après la dernière administration de fipronil pour les expériences 1 et 4, et environ 7 h après la dernière administration de fipronil pour les expériences 2 et 3.

5.2 Expériences réalisées sur les moutons

Des brebis de race Lacaune et des béliers croisés de un à deux ans ont été achetés à l'Union des Agriculteurs du Comminges de l'Isle en Dodon ou au Domaine de la Fage,

INRA, France. Les animaux sont restés en photopériode naturelle et ont reçu des rations d'entretien quotidiennes de concentré. Ils ont eu accès à du foin et de l'eau *ad libitum*.

Lorsque les animaux étaient thyroïdectomisés, l'intervention chirurgicale s'est faite sous anesthésie induite par du thiopental sodique (15 mg/kg, IV, Nesdonal[®], Merial, France) et maintenue avec 1.5 % d'isoflurane-O₂ (Aérane, Baxter SA, Maurepas, France). Les animaux ont reçu par voie intramusculaire de l'amoxicilline et de l'acide clavulanique (respectivement 17 mg/kg/j et 4 mg/kg/j, Synulox[®], Pfizer, Paris, France) jusqu'à trois jours après l'opération.

Dans toutes les expériences, les prélèvements sanguins ont été faits par ponction directe à la veine jugulaire droite et le sang collecté dans des tubes héparinés (héparinate de lithium). Les prélèvements ont été centrifugés à 3000 g pendant 10 min à 4 °C et les échantillons de plasma ont été stockés à -20 °C jusqu'aux dosages.

6. Produits chimiques et préparation des solutions

Tous les produits chimiques ont été achetés chez Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) à moins que ce ne soit spécifié autrement.

Le fipronil (lot N° B20050318, pureté 95.6 %) a été acheté chez 3B Medical Systems Inc. (Libertyville, IL, USA). Le fipronil a été administré aux animaux soit oralement soit par voie intraveineuse (IV). Lorsque le fipronil a été administré oralement, une solution témoin de méthyl cellulose (0.5 % p/p) et de Tween 80 (0.01 % p/v) a été préparée dans laquelle le fipronil a été vigoureusement mélangé à l'abri de la lumière afin d'obtenir une suspension homogène de 1.5 et 6 mg/mL respectivement pour les rats et les moutons. Lorsque le fipronil a été administré par voie IV, il a été dissous extemporanément à 20 mg/mL dans de l'éthanol absolu (Scharlau, Barcelona, Espagne).

Les solutions d'antipyrine pour les cinétiques (30 et 400 mg/mL respectivement pour les rats et les moutons) et les solutions de phénobarbital pour le traitement au phénobarbital (0.25 g/mL) ont été préparées extemporanément dans de l'eau pour préparation injectable (Aguettant, Lyon, France).

7. Dosages

7.1 Dosages hormonaux

Les concentrations plasmatiques des HT libres et totales chez le rat et le mouton ont été mesurées à l'aide de kits radioimmunologiques (RIA) Coat-A-Count[®] de Diagnostic Products Corporation (Los Angeles, Californie, USA). Les concentrations plasmatiques de TSH

chez le rat ont été déterminées à l'aide des kits RIA de GE Healthcare (Buc, France) et Biocodehycl (Massy, France). Tous les dosages ont été réalisés suivant les instructions des fournisseurs. Pour les moutons, le dosage de TSH a été réalisé en utilisant les réactifs du National Institute of Health (Bethesda, Maryland, USA) selon la méthode décrite par Dahl *et al.* [152]. Tous les échantillons ont été mesurés en duplicate à l'exception des échantillons des cinétiques de T4 qui ont été dosés en simple.

Pour l'ensemble des dosages hormonaux chez le rat, les coefficients de variation moyens intra- et inter-dosages de trois points de contrôle qualité (QC) ont été inférieurs à respectivement 8 % et 13 % pour tous les dosages. Les coefficients moyens de variation intra- et inter-dosage pour les dosages hormonaux sur le plasma de mouton ont été inférieurs à respectivement 10 % et 15 % pour tous les dosages. La limite de quantification inférieure (LLOQ) de TT4 chez le rat et le mouton a été déterminée à 5 ng/mL ; celle du dosage de TSH chez le mouton a été validée à 0.5 ng/mL. La limite de détection des autres dosages a été fixée à celle du plus faible point de gamme soit respectivement 11 pg/mL, 0.52 pg/mL et 0.2 ng/mL pour les dosages de FT4, FT3 et TT3.

7.2 Dosage de fipronil et fipronil sulfone

7.2.1 Dosage par HPLC détection UV

Les concentrations plasmatiques de fipronil et fipronil sulfone ont été déterminées par HPLC couplée à un détecteur ultraviolet (UV) après extraction sur phase solide du plasma avec 75 ng de standard interne (4-chlorophényl 5-méthyl 2-H-pyrazole, 1 µg/mL) sur cartouche SPE (Bond Elut C8 Varian® 100 mg, Les Ulis, France). La cartouche a été lavée avec 1 mL de solution eau-acétonitrile (95/5, v/v) et l'élution s'est faite avec 1 mL de méthanol. Après reconstitution sous vapeur d'azote à 40 °C, l'extrait sec a été reconstitué avec 75 µL d'eau-méthanol (50/50, v/v). Les analyses ont été réalisées sur une chaîne HPLC Kontron (Paris, France). La phase mobile (méthanol-acide acétique 0.005 N, (67/33, v/v)) a été pompée à un débit de 0.4 mL/min. La colonne (Nucléosil® C18, 3 µm, 125 x 4 mm avec une pré colonne C18 10 µm, Bischoff, Allemagne) a été maintenue à 40 °C. La détection UV s'est faite à 275 nm. La gamme étalon s'étendait de 25 à 2500 ng/mL pour le mouton et de 100 à 2500 ng/mL pour le rat. L'équation de la courbe d'étalonnage a été obtenue par ajustement des données (rapport de l'aire du pic/ l'aire du standard interne *vs.* les concentrations théoriques) suivant une équation linéaire avec $1/(\text{concentrations théoriques})^2$ comme facteur de pondération.

Pour les échantillons de plasma de rat, l'extraction a été réalisée sur un volume de 150 µL de plasma. Le coefficient d'extraction moyen pour le standard interne a été de 86 %. Le coefficient moyen de variation intra-dosage de trois QC de 160, 800 et 1600 ng/mL a été inférieur à 8.5 % pour le fipronil et le fipronil sulfone et le coefficient moyen de variation inter-dosage a été inférieur à 7.5 % pour le fipronil et 10 % pour le fipronil sulfone. L'exactitude a été de 97 ± 2 % pour le fipronil et de 102 ± 9 % pour le fipronil sulfone. La LLOQ a été le point de gamme de plus faible concentration soit 100 ng/mL pour le fipronil et le fipronil sulfone.

Pour les échantillons de plasma de mouton, l'extraction a été réalisée sur un volume de plasma de 500 µl. Trois QC de 80, 800 et 1500 ng/mL ont été utilisés pour la validation. Le coefficient moyen de variation intra-dosage des trois QC a été inférieur à 7 % pour le fipronil et 6 % pour le fipronil sulfone, et le coefficient moyen de variation inter-dosage a été inférieur à 10 % pour le fipronil et 9 % pour le fipronil sulfone. L'exactitude a été de 84 ± 17 % pour le fipronil et le fipronil sulfone. La LLOQ a été validée selon les normes de la Food and Drug Administration des Etats-Unis [153] à 25 et 50 ng/mL respectivement pour le fipronil et le fipronil sulfone.

7.2.2 Dosage du fipronil et fipronil sulfone par HPLC/MS/MS chez le rat

Ce dosage a été réalisé afin de caractériser l'exposition de rats traités au fipronil (3 mg/kg/j, PO pendant 14 jours). Les échantillons ont été dosés par HPLC/MS/MS (High Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry) par Avogadro (Fontenilles, France) afin d'améliorer les LLOQ et optimiser le dosage pour un faible volume d'échantillon. Cinquante µL de plasma de rat préalablement centrifugés 5 min à 3000 g à 5 °C ont été soumis à une extraction liquide-liquide. Dix µL d'acétonitrile/eau purifiée (50/50 ; v/v) ont été ajoutés au plasma et vortexés 30 s. Un mL de tert-butyl methyl ether a été ajouté au plasma, vortexé 30 s et la préparation a été centrifugée 5 min à 16060 g à 5 °C. La phase supérieure a été récupérée dans sa totalité puis évaporée sous azote à 25 °C. L'extrait sec a été reconstitué avec 150 µL de méthanol-acétate d'ammonium 5 mM (90/10, v/v) puis vortexé 30 s. L'échantillon a été transféré dans un tube pour filtration (0.2 µm, Whatman Anapore) et centrifugé à 16060 g pendant 5 min à 5 °C. Vingt µL du filtrat ont été injectés sur une chaîne HPLC Alliance 2695 couplée à un spectromètre de masse triple quadripolaire Quattro MicroTM API (Waters Corporation, Saint Quentin en Yvelines, France). Les molécules ont été séparées sur une colonne C18 Hypersil BDS (100 x 3 mm; 3 µm; Thermo Electron

Corporation, Courtaboeuf, France) à un débit de 0.2 mL/min suivant le gradient : t=0 à t=1 min, 50 % d'acétate d'ammonium 5 mM et 50 % méthanol, t=1 min à t=10 min, 10 % d'acétate d'ammonium 5 mM et 90 % méthanol. La colonne a été ensuite rééquilibrée à 50 % d'acétate d'ammonium 5 mM et 50 % méthanol pendant 10 min. La détection en spectrométrie de masse a été réalisée en mode « multiple reaction monitoring » (MRM) avec une ionisation électrospray négative (ESI-). Le potentiel du capillaire a été réglé à 2 kV pour le fipronil et le fipronil sulfone ; celui du cône a été réglé à 27 et 32 V respectivement pour le fipronil et le fipronil sulfone. La température de dessolvation et celle dans la source ont été fixées à respectivement 400 et 120 °C. Les transitions suivies pour les analyses du fipronil et du fipronil sulfone ont été respectivement m/z : 435 > 330 et m/z : 451 > 415, avec une énergie de collision de respectivement 16 et 17 eV. Les analyses ont été acquises et traitées avec le logiciel MassLynx 3.5 (Waters Corporation, Saint Quentin en Yvelines, France). Les gammes de fipronil et fipronil sulfone s'étendaient de 5 à 100 ng/mL.

7.2.3 Dosage du fipronil et fipronil sulfone par HPLC/MS/MS chez le mouton

Les échantillons ont été dosés par HPLC/MS/MS par Avogadro (Fontenilles, France). Deux cents µL de plasma ont été soumis à une extraction liquide-liquide. Deux mL de tert-butyl methyl ether ont été ajoutés au plasma, agités à 80 rotations/min et centrifugés 5 min à 5000 g à 5 °C. Le surnageant a été récupéré dans sa totalité et évaporé sous azote. L'extrait a été reconstitué avec 200 µL de méthanol-H₂O (40/60, v/v). Ensuite, 150 µL d'hexane ont été ajoutés et le mélange a été vortexé 10 s et centrifugé 5 min à 16000 g à 5 °C. Trente µL de la phase inférieure ont été injectés sur une chaîne HPLC Alliance 2695 couplée à un spectromètre de masse triple quadripolaire Quattro Micro™ API (Waters Corporation, Saint Quentin en Yvelines, France). Les molécules ont été séparées sur une colonne C18 Hypersil BDS (100 x 3 mm; 3 µm; Thermo Electron Corporation, Courtaboeuf, France) à un débit de 0.2 mL/min suivant le gradient : t=0 à t=1 min, 60 % H₂O acidifiée avec 0.1 % d'acide formique et 40 % d'acétonitrile acidifié avec 0.1 % d'acide formique, t=5 min à t=8 min, 10 % H₂O acidifiée et 90 % d'acétonitrile acidifiée. La colonne a ensuite été rééquilibrée avec 60 % H₂O et 40 % d'acétonitrile. La détection en spectrométrie de masse a été réalisée en mode MRM avec une ionisation électrospray positive (ESI+). Les potentiels du capillaire et du cône ont été réglés à respectivement 3 kV et 31 V. La température de dessolvation et celle dans la source ont été fixées respectivement à 450 et 130 °C. Les transitions suivies pour les analyses du fipronil et du fipronil sulfone ont été

respectivement m/z : 437 > 368 et m/z : 453 > 320, avec une énergie de collision de respectivement 25 et 26 eV. Les analyses ont été acquises et traitées avec le logiciel MassLynx 4.0 (Waters Corporation, Saint Quentin en Yvelines, France). Les gammes de fipronil et fipronil sulfone s'étendaient respectivement de 1 à 100 ng/mL et de 5 à 500 ng/mL.

7.3 Dosage de l'antipyrine

Les concentrations plasmatiques d'antipyrine ont été déterminées par HPLC couplée à un détecteur UV après extraction sur phase solide du plasma surchargé avec 1 µg de standard interne (acétophénétidine, 10 µg/mL) sur cartouche SPE (Bond Elut C8 Varian® 100 mg, Les Ulis, France). L'élution s'est faite avec 1 mL de dichlorométhanol-méthanol (85/15, v/v). L'éluat a été évaporé à la vapeur d'azote à 40 °C et reconstitué avec 100 µL d'eau-méthanol (50/50, v/v). Les analyses ont été réalisées sur une chaîne HPLC Kontron (Paris, France) en conditions isocratiques. La phase mobile (acétonitrile-tampon phosphate 25 mM, pH=7.2 (25/75, v/v)) a été pompée à un débit de 0.6 mL/min à travers une colonne maintenue à 40 °C (Inertsil ODS3® C18, 3 µm, 150 x 4 mm avec une pré colonne Inertsil ODS3® 10x4 mm, Bischoff, Allemagne). La détection UV s'est faite à 254 nm. La gamme étalon s'étendait respectivement de 0.3 à 40.0 µg/mL et de 0.2 à 20.0 µg/mL pour les rats et les moutons. L'équation de la courbe d'étalonnage a été obtenue par ajustement des données (rapport de l'aire du pic/ l'aire du standard interne *vs.* les concentrations théoriques) suivant une équation linéaire en utilisant une régression linéaire avec $1/(\text{concentrations théoriques})^2$ comme facteur de pondération.

Pour les échantillons de plasma de rat, l'extraction a été réalisée sur un volume de plasma de 150 µL. Le rendement d'extraction moyen pour le standard interne a été de 86 %. L'exactitude a été de 98.3 ± 0.7 %. Les coefficients de variation moyens intra- et inter-dosage des trois QC (0.5, 3 et 12 µg/mL) ont été inférieurs à 5 %. La LLOQ a été validée à 0.3 µg/mL.

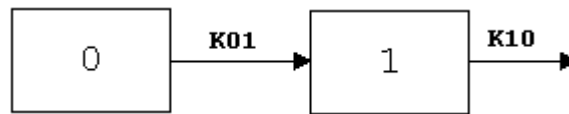
Pour les échantillons de plasma de mouton, l'extraction a été réalisée sur un volume de plasma de 150 µL. Les coefficients de variation moyens intra- et inter-dosage des trois QC (0.8, 3.5 et 12 µg/mL) ont été inférieurs à respectivement 2 % et 7 %. L'exactitude a été de 86 ± 7 %. La LLOQ a été validée à 0.2 µg/mL.

8. Analyses pharmacocinétiques

Toutes les analyses PK ont été réalisées en utilisant le logiciel WinNonlin® (WinNonlin® 5.2, Pharsight Corporation, CA, USA). L'évolution temporelle des concentrations plasmatiques des différentes substances administrées (T4, antipyrine, fipronil) a été ajustée avec la méthode des moindres carrés selon une équation polyexponentielle correspondant à un modèle PK. Le choix de ce modèle PK a été guidé par le critère d'Akaike [154]. Les données ont été pondérées par l'inverse du carré des valeurs ajustées à moins que ce ne soit spécifié autrement.

Quatre types de modèles différents correspondant à quatre équations polyexponentielles différentes ont servi à ajuster les données.

L'évolution temporelle des concentrations plasmatiques de FT4, TT4 et d'antipyrine, après administration IP de T4 ou d'antipyrine chez les rats, a été ajustée à une équation biexponentielle (1) correspondant à un modèle monocompartimental avec une phase d'absorption d'ordre 1 représenté par le schéma ci-dessous.



$$C(t) = \frac{F \times D \times K_{01}}{V \times (K_{01} - K_{10})} \times (\exp(-K_{10} \times t) - \exp(-K_{01} \times t)) \quad (1)$$

où $C(t)$ est la concentration plasmatique au temps t , F est la biodisponibilité de la substance, D est la dose, V est le volume de distribution (mL/kg), K_{01} (h^{-1}) est la constante de vitesse d'absorption d'ordre 1 et K_{10} (h^{-1}) est la constante de vitesse d'élimination d'ordre 1. Le temps de demi-vie de la phase terminale ($t_{1/2}$) a été défini comme le rapport $\frac{\ln(2)}{K_{10}}$ et T_{\max} ,

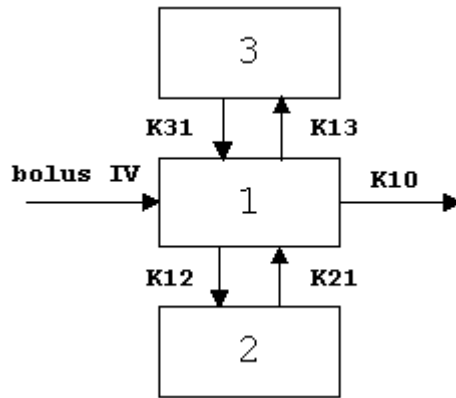
le temps d'occurrence de la concentration maximale (C_{\max}) comme $\frac{\ln(K_{01}/K_{10})}{K_{01} - K_{10}}$. L'aire sous

la courbe (AUC) du point zéro à la dernière concentration mesurable a été calculée comme

étant égale à $AUC = \frac{D}{F} \times \frac{V}{K_{10}}$ avec $\frac{V}{F} \times K_{10}$ la clairance apparente (clairance/F).

Le même modèle a été utilisé pour déterminer la demi-vie terminale du fipronil sulfone lors de la cinétique IV de fipronil ayant servi à déterminer les paramètres PK du fipronil chez le mouton.

L'évolution temporelle des concentrations plasmatiques de FT4, TT4 et du fipronil, observée après l'administration IV de T4 ou de fipronil, a été ajustée à une équation triexponentielle (2) correspondant à un modèle tricompartmental représenté par le schéma ci-dessous.



$$C(t) = Y_1 \exp(-\lambda_1 \times t) + Y_2 \exp(-\lambda_2 \times t) + Y_3 \exp(-\lambda_3 \times t) \quad (2)$$

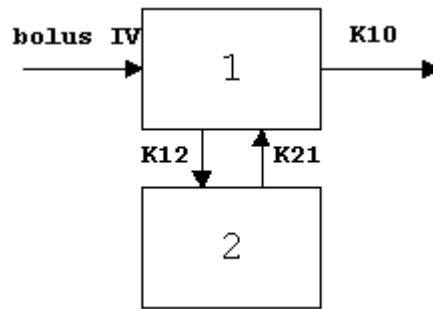
où $C(t)$ est la concentration plasmatique au temps t , Y_i (ng/mL pour TT4 et fipronil; pg/mL pour FT4) le coefficient du $i^{\text{ème}}$ terme exponentiel; λ_i (h^{-1}) la constante de vitesse d'ordre 1 de la $i^{\text{ème}}$ phase. L'AUC a été calculée de $t=0$ à la dernière concentration détectable en utilisant la méthode des log trapèzes. La clairance a été calculée comme étant égale au rapport $\frac{Dose}{AUC}$, le $t_{1/2}$ a été défini comme le rapport $\frac{\ln(2)}{\lambda_3}$ et le volume de distribution à

l'état d'équilibre V_{ss} comme égal à $\frac{MRT}{CL}$ avec le temps moyen de résidence (MRT) égal à

$\frac{AUMC}{AUC}$ où l'AUMC est l'aire sous la courbe du premier moment statistique observée après

l'administration IV de fipronil ou de T4. Pour l'analyse des concentrations plasmatiques de fipronil lors du traitement IV des moutons, la méthode de Nelder-Mead a été utilisée comme méthode de minimisation de la somme des carrés des résiduelles et les données ont été pondérées par l'inverse du carré des valeurs observées.

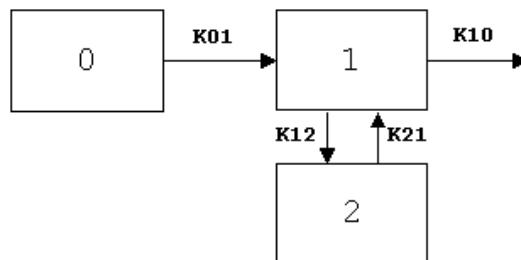
L'évolution temporelle des concentrations plasmatiques d'antipyrine chez le mouton, observée par administration IV d'antipyrine, a été ajustée à une équation biexponentielle (3) correspondant à un modèle bicompartimental représenté par le schéma ci-dessous.



$$C(t) = Y_1 \exp(-\lambda_1 \times t) + Y_2 \exp(-\lambda_2 \times t) \quad (3)$$

où $C(t)$ est la concentration plasmatique au temps t , Y_i ($\mu\text{g/mL}$) le coefficient du $i^{\text{ème}}$ terme exponentiel; λ_i (h^{-1}) la constante de vitesse d'ordre 1 de la $i^{\text{ème}}$ phase. L'AUC a été calculée de $t=0$ à la dernière concentration détectable en utilisant la méthode des log trapèzes. La clairance (CL) a été calculée comme étant égale au rapport $\frac{Dose}{AUC}$ et $t_{1/2}$ a été défini comme le rapport $\frac{\ln(2)}{\lambda_2}$. Le V_{ss} a été obtenu avec l'équation $V_{ss} = V_c \times (1 + \frac{K_{12}}{K_{21}})$.

Enfin, l'évolution temporelle des concentrations plasmatiques de fipronil tout au long du traitement au fipronil administré PO chez les moutons a été ajustée à une équation triexponentielle (4) correspondant à un modèle bicompartmental avec une phase d'absorption d'ordre 1 représenté par le schéma ci-dessous.



$$C(t) = Y_1 \exp(-\lambda_1 \times t) + Y_2 \exp(-\lambda_2 \times t) + (Y_1 + Y_2) \exp(-K_{01} \times t) \quad (4)$$

La méthode de Nelder-Mead a été utilisée comme méthode de minimisation de la somme des carrés des résiduelles. Les données ont été pondérées par l'inverse du carré des valeurs observées.

9. Développement d'un modèle « euthyroïdien » dépourvu de T4 pour évaluer la clairance de FT4 et TT4 chez le rat et le mouton

9.1 Intérêt et présentation du modèle

La clairance de la T4, définie par le volume de plasma épuré de T4 par unité de temps, se calcule à partir du rapport entre une dose connue de T4 exogène administrée et l'AUC des concentrations de T4 exogène en fonction du temps. La forme radiomarquée à l'iode 125 de T4 est couramment utilisée pour pouvoir différencier la T4 exogène administrée de la T4 endogène produite par la glande thyroïde. Fréquemment, seule la quantité de radioactivité totale présente dans les échantillons de sang est mesurée, ce qui a notamment été le cas pour l'étude de l'effet du fipronil sur la clairance de la T4 chez le rat. Or, cette quantité correspond à la somme de la radioactivité portée par les différentes molécules marquées pouvant être formées à partir de la T4 radiomarquée : de l'iode 125 libre, de la T3... La détection de T4 radiomarquée par HPLC est nécessaire pour déterminer spécifiquement l'évolution des concentrations de T4 exogène au cours du temps mais cette détection n'est pas systématiquement effectuée.

De plus, cette méthode ne permet pas de différencier la forme libre des HT de la forme liée aux protéines de transport, la forme libre des HT étant celle accessible aux cellules et donc potentiellement capable d'exercer une action biologique [155].

Face à ces limites, nous avons donc développé un modèle « euthyroïdien » dépourvu de T4 (THX+T3) permettant de suivre simultanément l'évolution temporelle des concentrations plasmatiques de FT4 et TT4 suite à une administration unique de T4 exogène. Pour cela, la source principale de T4 endogène a été éliminée par thyroïdectomie et des administrations sous cutanées (SC) quotidiennes de T3 ont été effectuées afin de restaurer des concentrations plasmatiques de TT3 les plus proches possibles des concentrations physiologiques. De la T4 non radiomarquée a été administrée et l'évolution des concentrations plasmatiques de FT4 et TT4 au cours du temps a été déterminée par dosage RIA.

Dans ce modèle, il était crucial de maintenir des concentrations physiologiques de T3 pour plusieurs raisons : 1) la T3 régule l'expression et l'activité des CYP [156, 157] notamment le CYP3A4 qui métabolise le fipronil chez l'homme [143]; 2) les UDPGT, qui jouent un rôle important dans l'élimination de la T4, notamment chez le rat, sont également régulées par la T3 [158, 159]. Le maintien de concentrations physiologiques de T3 était donc primordial pour obtenir des expositions au fipronil et au fipronil sulfone comparables à celles

des animaux dotés d'une fonction thyroïdienne normale ainsi que des conditions physiologiques d'élimination de la T4. Enfin, le maintien de concentrations physiologiques de T3 était critique chez le rat pour empêcher la réexpression de la TBG, non détectable chez le rat adulte [64] mais qui est à nouveau exprimée à des niveaux détectables chez le rat adulte suite à une thyroïdectomie [160].

9.2 Conditions expérimentales

Les animaux THX ont été traités à la T3 dès le lendemain de la thyroïdectomie et ce jusqu'à la fin des expériences par des administrations SC quotidiennes de T3 à respectivement 12 µg/kg et 1.5 µg/kg pour les rats et les moutons.

Pour les rats, la décroissance temporelle des concentrations plasmatiques de T4 a été suivie suite à l'administration unique de T4 (10 µg/kg, IP). Des prélèvements de 250 µL de sang ont été collectés environ 20 h avant puis 0.25, 1, 2, 4, 8, 23 et 28 h après l'administration de T4 (t=0 min) afin de suivre l'évolution des concentrations plasmatiques de T4. Les concentrations plasmatiques moyennes de TT3 ont été mesurées le jour de la cinétique de T4 soit 5 h après l'injection SC de T3 et 4 h après l'administration IP de T4.

Chez le mouton, une expérience préliminaire étudiant l'effet du fipronil sur la clairance de la T4 chez des brebis THX sans traitement à la T3 a été réalisée. Cependant, l'exposition au fipronil et au fipronil sulfone s'est révélée très différente de celle observée chez des animaux à thyroïde intacte. Le même modèle expérimental (THX+T3) que celui développé chez le rat a donc été développé chez le mouton. Les paramètres PK de FT4 et TT4 ont été évalués deux semaines après la thyroïdectomie en suivant l'évolution des concentrations plasmatiques au cours du temps après une administration IV unique de T4 (10 µg/kg). Les prélèvements de sang ont été effectués 30 min et 0 min avant puis 1, 2, 4, 8, 15, 30 min et 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 24, 48, 72, 96, 120, 144 et 168 h après l'administration de T4. Les concentrations plasmatiques moyennes de TT3 ont été mesurées sur les prélèvements témoins prélevés le jour des cinétiques de T4 juste avant l'administration de T4 pour chacune des deux périodes.

9.3 Tableau de résultats et discussion

Tableau 3 : Valeurs des clairances de FT4, TT4 et des concentrations plasmatiques de TT3 obtenues dans notre modèle THX + T3 chez le rat et le mouton par rapport aux valeurs de la littérature

	Brebis THX+T3 témoins	Moutons	Rates THX+T3 témoins	Rats
Clairance TT4 (mL/min/kg)	0.02 ± 0.01	0.04 ¹	0.16 ± 0.04	0.16 à 0.18 ²
Clairance FT4 (mL/min/kg)	178 ± 22	-	618 ± 170	-
TT3 (ng/mL)	0.6 ± 0.1 à 1.0 ± 0.2	0.8 à 1.6	1.4 ± 0.3	0.4 à 0.5

¹[74, 161] ; ²[76, 162] ;

Les concentrations plasmatiques de TT3 chez les brebis THX+T3 sont dans la gamme des valeurs physiologiques. En ce qui concerne les rats, les concentrations plasmatiques de TT3 sont élevées mais restent dans les valeurs physiologiques. Il est possible que ces concentrations élevées résultent en partie de la désiodation de la T4 administrée pour la cinétique [163] et soient donc plus élevée que les concentrations maintenues au cours de l'expérience. La clairance apparente de TT4 des rats dans notre expérience est proche des valeurs de la littérature. De même, la clairance de TT4 chez les brebis THX+T3 est de l'ordre de grandeur des données de la littérature, démontrant ainsi la pertinence physiologique de ce modèle dans les deux espèces. La clairance de TT4 chez l'homme est de l'ordre de 1 L/j [58] soit 0.01 mL/min/kg pour une personne de 60 kg. La clairance de la T4 chez le mouton, notamment dans notre modèle, est donc plus proche de l'homme que ne l'est celle du rat.

En ce qui concerne la clairance de FT4 chez le rat, celle-ci (environ 600 mL/min/kg) est environ deux fois supérieure au débit cardiaque du rat (environ 300 mL/min/kg) [164]. Cette valeur élevée de clairance poserait un problème conceptuel si la T4 était éliminée uniquement par les organes d'élimination de l'organisme (foie, reins, poumons) car la clairance plasmatique ne peut être supérieure au débit cardiaque [165]. Cependant, la T4 peut être prise en charge et désiodée en T3 par d'autres cellules de l'organisme que celles des organes « épurateurs ». Le débit sanguin n'est donc plus un facteur limitant car ce ne sont pas uniquement les organes « épurateurs » qui éliminent la T4 mais potentiellement toutes les cellules de l'organisme.

Le modèle THX+T3 présente cependant quelques limites car il n'intègre pas les interactions potentielles entre le xénobiotique et le métabolisme de la T3. Le métabolisme de la T4 dépend en partie des concentrations plasmatiques de T3 : la clairance de la T4 est plus faible chez des rats THX [162, 163]. Le changement des concentrations plasmatiques de T3 pourrait interférer avec l'effet propre du xénobiotique sur la clairance de la T4. Si un xénobiotique entraîne par exemple une diminution des concentrations de T3, celle-ci risque de réduire voire de « masquer » une éventuelle augmentation de la clairance de la T4 par ce même xénobiotique. Il est donc capital de mesurer les concentrations plasmatiques de T3 dans ce modèle afin de pouvoir déterminer si une éventuelle absence d'effet sur la clairance de la T4 pourrait être due à une différence d'exposition à la T3.

De même, les CYP, qui sont régulés en partie par la T3 [156, 157], sont responsables du métabolisme de nombreux xénobiotiques dont le fipronil. Si le xénobiotique entraîne une diminution des concentrations de T3, il peut modifier son propre métabolisme ce qui pourrait conduire à une exposition au xénobiotique et à son/ses métabolite(s) différente des conditions physiologiques.

*CARACTERISATION DE LA
PERTURBATION THYROIDIENNE
ET MODE D'ACTION DU FIPRONIL
SUR LA FONCTION THYROIDIENNE
CHEZ LE RAT*

1. INTRODUCTION

Les seules données disponibles sur la toxicité du fipronil sur la fonction thyroïdienne sont des résultats d'études réalisées chez le rat par l'industrie pharmaceutique à des fins réglementaires et proviennent donc de rapports non évalués par des comités de lecture [147, 150]. Ces études ont montré que le fipronil peut perturber la fonction thyroïdienne chez le rat. Dans cette espèce, un traitement au fipronil (17 mg/kg/j, PO, pendant 52 semaines) a provoqué une augmentation significative de l'incidence des tumeurs de la glande thyroïde associée à des concentrations plasmatiques de TSH augmentées et des concentrations plasmatiques de TT4 diminuées. Une diminution des concentrations plasmatiques de TT4 a également été observée à des doses de fipronil aussi faibles que 0.078 mg/kg/j et cela dès sept jours de traitement. De plus, le fipronil (10 mg/kg/j, PO, pendant 14 jours) a augmenté les clairances plasmatiques et biliaires de [¹²⁵I]T4 [71, 150]. L'ensemble de ces résultats a conduit à proposer un schéma physiopathologique hypothétique du mode d'action du fipronil : celui-ci induirait les systèmes enzymatiques hépatiques responsables de l'élimination de la T4 ce qui augmenterait la clairance de la T4 et aboutirait finalement à une réduction des concentrations plasmatiques de T4. Ces concentrations diminuées de T4 seraient en partie responsables de l'augmentation des concentrations plasmatiques de TSH, le rétrocontrôle négatif exercé par la T4 sur la sécrétion de TSH étant diminué. Or, chez le rat, une exposition prolongée de la thyroïde à des concentrations élevées de TSH favoriserait le développement de tumeurs folliculaires [27, 71, 166].

Cependant, les divers résultats de ces études toxicologiques ont été obtenus dans des conditions de traitement au fipronil différentes aussi bien en termes de durée de traitement qu'en termes de dose administrée. La diminution des concentrations plasmatiques de T4 a été observée à une dose plus faible et pour une durée d'exposition au fipronil plus courte que celles utilisées pour démontrer les effets sur la clairance de la T4 (0.078 mg/kg/j *vs.* 10 mg/kg/j et sept jours *vs.* 14 jours). La relation de cause à effet entre ces deux résultats n'étant pas établie, le schéma physiopathologique proposé ne peut être définitivement validé.

De plus, au cours de ces études, la détermination de la clairance de la T4 a été réalisée par suivi de la décroissance au cours du temps de la radioactivité totale présente dans des échantillons suite à une administration de T4 radiomarquée, technique dont les limites ont été exposées précédemment.

L'exposition au fipronil, c'est-à-dire les concentrations plasmatiques de fipronil et de son principal métabolite, le fipronil sulfone [143], n'a jamais été caractérisée dans ces études toxicologiques. Ainsi, la pertinence de l'exposition du rat au fipronil obtenue dans ces expérimentations par rapport à l'exposition potentielle chez l'homme ne peut pas être évaluée. Enfin, le schéma physiopathologique proposé implique que le fipronil pourrait être un inducteur des systèmes enzymatiques hépatiques afin d'augmenter la clairance de la T4. Cependant, les données *in vitro* et *ex vivo* sur cette propriété du fipronil sont contradictoires. *In vitro*, le fipronil augmente l'expression et l'activité des CYP3A4 et 1A1 d'hépatocytes humains [148] ce qui est compatible avec un pouvoir inducteur possible du fipronil sur les enzymes hépatiques chez le rat. A l'inverse, aucun effet concluant du fipronil n'a pu être mis en évidence sur les activités enzymatiques microsomales de phase I et de phase II provenant de rats, de lapins ou de souris traités au fipronil (1.2 or 5 mg/kg/j pendant 4 ou 14 jours) [147].

Les objectifs de cette première partie ont donc été de :

- caractériser précisément la perturbation thyroïdienne induite par le fipronil sur les concentrations plasmatiques des HT et de TSH chez le rat
- documenter le mode d'action du fipronil sur l'élimination de la T4 au niveau hépatique chez le rat
- caractériser l'exposition des animaux au fipronil et fipronil sulfone pour pouvoir déterminer la pertinence des résultats obtenus par rapport à une exposition humaine.

Nous avons tout d'abord déterminé les effets du fipronil sur les concentrations plasmatiques des HT libres et totales ainsi que sur celles de TSH. Nous avons ensuite plus particulièrement étudié l'effet du fipronil sur les clairances de FT4 et de TT4 à l'aide de notre modèle expérimental THX+T3. Afin de clarifier le mode d'action hépatique possible du fipronil, nous avons enfin déterminé les effets du fipronil à la fois *in vivo* sur l'activité « globale » des CYP, en utilisant la clairance de l'antipyrine comme marqueur, et *ex vivo* sur l'activité microsomale des UDPGT vis-à-vis du 4-nitrophénol.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1 Traitement au fipronil

Le même traitement au fipronil a été utilisé dans toutes les expériences. La suspension de fipronil (1.5 mg/mL) a été agitée à l'abri de la lumière avant chaque administration. Les animaux ont été gavés tous les jours avec la suspension de fipronil afin de délivrer une dose de 3 mg/kg/j de fipronil ou un volume équivalent de solution témoin pendant 14 jours, et 28 jours pour l'expérience 1 uniquement. Le volume de suspension à administrer a été ajusté au dernier poids corporel mesuré.

2.2 Caractérisation de l'exposition de rates au fipronil et au fipronil sulfone dans nos conditions de traitement

Trois rates Wistar ont été équipées d'un cathéter à la veine fémorale gauche. Un mois après l'intervention, les rates ont été traitées au fipronil pendant 14 jours comme décrit précédemment. L'exposition au fipronil et au fipronil sulfone a été suivie par mesure des concentrations plasmatiques dans des prélèvements sanguins de 250 µL réalisés 2, 5, 8, 24 et 72 h après la première administration de fipronil, au 10^e jour de traitement et 2, 5, 8, 24 et 100 h après la dernière administration de fipronil.

2.3 Expérience 1 : effet du fipronil sur les concentrations plasmatiques des HT et de TSH

Cette expérience a été réalisée avec 28 rates de poids corporel moyen de 255 ± 8 g au début de l'expérience. Les animaux ont été répartis aléatoirement en quatre groupes de sept animaux. Deux groupes ont été traités au fipronil comme décrit précédemment pendant 14 et 28 jours. Les deux autres groupes, constitués des animaux témoins, ont été traités avec la solution témoin pendant les mêmes durées de traitement. Les animaux ont été rapidement euthanasiés par décapitation entre 25 et 25.5 h après la dernière administration de fipronil et le sang total a été récupéré dans des tubes héparinés (héparinate de lithium). Le premier rat a été sacrifié 45 min après le début de la période d'obscurité et une alternance entre rat traité et rat témoin a été respectée.

2.4 Expérience 2 : effet du fipronil sur les paramètres PK de la T4

Dix huit rates ont été réparties aléatoirement en un groupe témoin (n=10) et un groupe de rates traitées au fipronil (n=8). Les animaux ont été thyroïdectomisés puis traités

à la T3 (12 µg/kg/j, SC) de 24 h après la thyroïdectomie jusqu'à la fin de l'expérience afin d'obtenir des concentrations physiologiques de TT3 ainsi que précédemment décrit. Vingt quatre h après la dernière administration de fipronil, la clairance de la T4 a été évaluée comme décrit dans le chapitre précédent.

2.5 Expérience 3 : effet du fipronil sur les paramètres PK de l'antipyrine

L'effet du fipronil *in vivo* sur l'activité des enzymes hépatiques de phase I a été évalué en étudiant l'effet du fipronil sur les paramètres PK de l'antipyrine, une molécule généralement utilisée pour tester le pouvoir oxydatif du foie [167] et plus particulièrement l'activité des CYP [168].

Dix sept rates ont été réparties aléatoirement en un groupe de rates témoins (n=8) et un groupe de rates traitées au fipronil (n=9). Les paramètres PK de l'antipyrine ont été déterminés 24 h après la dernière administration de fipronil en suivant l'évolution des concentrations plasmatiques après une administration IP d'antipyrine (30 mg/kg) dans des prélèvements de 250 µL de sang collectés la veille puis 0.5, 1, 2, 3, 5, 7 et 9 h après l'administration d'antipyrine.

2.6 Expérience 4 : effet du fipronil sur l'activité de glucuroconjugaison du 4-nitrophénol par les UDPGT

Les UDPGT responsables de la glucuroconjugaison du 4-nitrophénol sont également impliquées dans la glucuroconjugaison de la T4 [169]. L'effet du fipronil sur l'activité de glucuroconjugaison du 4-nitrophénol par les UDPGT a donc été étudié. Vingt rates réparties aléatoirement en deux groupes de 10 rates ont été gavées avec la solution témoin ou du fipronil (3 mg/kg/j, PO) pendant 14 jours. Le jour suivant la dernière administration de fipronil, les rates ont été sacrifiées sous CO₂ suivi d'une saignée. Trois morceaux de foie ont été immédiatement prélevés et stockés à -80 °C après congélation rapide dans de l'azote liquide. Les microsomes ont été préparés comme décrit précédemment [170] et la quantité de protéine a été déterminée par la méthode de Lowry *et al.* [171] avec l'albumine de sérum bovin comme standard. L'activité de glucuroconjugaison du 4-nitrophénol par les UDPGT a été mesurée d'après la méthode de Burchell et Weatherill. Le 4-nitrophénol (250 nM) a été incubé à 37 °C avec 2 mg de protéines microsomales dans une solution de Tris-maléate 0.25 M pH=7.4 – MgCl₂ 5 mM et de l'acide glucuronique à 4 mM (concentrations finales). La réaction a été arrêtée après 1 h avec 1 mL d'acide trichloracétique 0.5 M. Un volume de 800 µL de surnageant a été mélangé

à un volume équivalent de soude 2 M et 4.4 mL d'eau distillée. La glucuroconjugaison du 4-nitrophénol a été quantifiée par la mesure de la diminution de l'absorbance à 405 nm.

2.7 Analyses statistiques

Pour l'expérience 1, l'effet du traitement au fipronil sur les concentrations plasmatiques moyennes des HT et de TSH a été analysé avec une ANOVA à deux facteurs avec le traitement et la période (durée du traitement) comme facteurs à effets fixes. Cette analyse a été faite à l'aide du logiciel R (version 2.4.1, R Development Core Team, Vienne, Autriche). L'effet du traitement au fipronil sur les paramètres PK moyens de l'antipyrine, FT4, TT4 et de l'activité des UDPGT a été analysé par un test *t* de Student. Les résultats sont donnés en moyennes \pm écart type (ET).

3. RESULTATS

3.1 Caractérisation de l'exposition au fipronil et au fipronil sulfone

L'évolution des concentrations moyennes de fipronil et fipronil sulfone pendant le traitement au fipronil (3 mg/kg/j, PO, pendant 14 jours) sont représentées par la figure 3. Au 10^e jour, les concentrations plasmatiques de fipronil n'étaient plus détectables (LLOQ = 5 ng/mL) alors qu'elles l'étaient 24 h après la première administration de fipronil. Le C_{max} de fipronil, atteint dès 2 h post administration après la première administration de fipronil, a été diminué d'un facteur cinq lors de la dernière administration. De plus, la décroissance des concentrations plasmatiques de fipronil était plus rapide lors de la dernière administration de fipronil que lors de la première administration.

Le fipronil sulfone est apparu très rapidement après l'administration de fipronil avec des concentrations détectables dès 2 h post administration de la première dose de fipronil. Les concentrations plasmatiques de fipronil sulfone ont augmenté au cours du traitement. Elles semblent atteindre un état d'équilibre entre trois et 10 jours autour d'une concentration plasmatique moyenne de 700 ng/mL. Contrairement à la première administration de fipronil où elles ont augmenté progressivement jusqu'à 24 h, les concentrations de fipronil sulfone lors de la dernière administration de fipronil atteignent une concentration maximale à 5 h post administration puis diminuent bien plus lentement que celles de fipronil.

Le rapport moyen des concentrations plasmatiques de fipronil sulfone/fipronil après 24 h était d'environ 2.5 alors qu'à l'état d'équilibre (à 10 et 13 j), il se situait entre 130 et 150.

Les concentrations plasmatiques de fipronil et de fipronil sulfone mesurées à la fin des différentes expériences se trouvent dans le tableau 4. Les concentrations de fipronil étaient inférieures à la LLOQ du dosage réalisé au laboratoire (100 ng/mL) dans toutes les expériences ce qui est cohérent avec les résultats précédents. Comme dans le cas de l'expérience précédente, les animaux ont été beaucoup plus exposés au fipronil sulfone qu'au fipronil. Les animaux à thyroïde intacte des expériences 1, 3 et 4 ont eu des concentrations plasmatiques de fipronil sulfone supérieures aux animaux THX+T3 de l'expérience 2.

Tableau 4 : Concentrations plasmatiques moyennes de fipronil et fipronil sulfone de chaque expérience à la fin du traitement au fipronil

	Expérience 1 Jour 14 n=7	Expérience 1 Jour 28 n=7	Expérience 2 n=8	Expérience 3 n=9	Expérience 4 n=10
Concentrations plasmatiques de fipronil (ng/mL)	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100
Concentrations plasmatiques de fipronil sulfone (ng/mL)	2544 ± 219	2482 ± 296	1445 ± 132	1974 ± 274	3351 ± 799

Les rates ont été traitées au fipronil à 3 mg/kg/j PO pendant 14 jours ou 28 jours pour l'expérience 1 uniquement. Les concentrations plasmatiques de fipronil et fipronil sulfone ont été mesurées dans des échantillons collectés environ 25 h après la dernière administration de fipronil pour les expériences 1 et 4 et 7 h après la dernière administration de fipronil pour les expériences 2 et 3.

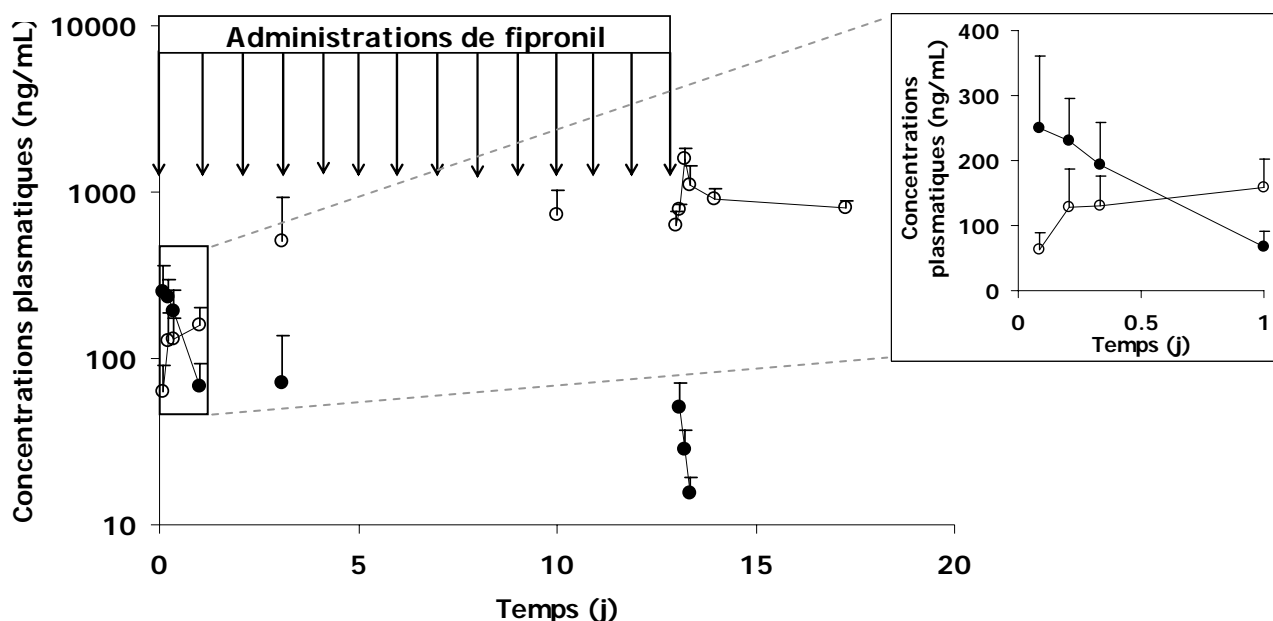


Figure 3 : Evolution des concentrations plasmatiques moyennes de fipronil et fipronil sulfone chez le rat lors d'un traitement au fipronil

Trois rates ont été traitées au fipronil à 3 mg/kg/j, PO pendant 14 jours. Le fipronil (●) et le fipronil sulfone (○) ont été dosés dans des échantillons collectés 2, 5, 8, 24, 72 h après la première administration de fipronil, au 10^e jour de traitement et 2, 5, 8, 24 et 100 h après la dernière administration de fipronil.

3.2 Expérience 1 : effet du fipronil sur les concentrations plasmatiques des HT et de TSH

Les poids corporels des rates du groupe témoin et du groupe traité au fipronil ont été similaires à la fin du traitement (267 ± 14 g *vs.* 269 ± 8 g respectivement pour le groupe témoin et le groupe traité au fipronil). La figure 4 décrit les concentrations moyennes de TT4, FT4, TT3, FT3 et TSH des groupes témoin et traité au fipronil à 14 et 28 jours de traitement. Le traitement au fipronil a été associé à une diminution significative des concentrations plasmatiques de TT4 et TT3 (effet du traitement $p < 0.02$ et $p < 0.01$ respectivement pour TT4 et TT3). Les concentrations plasmatiques de TT4 et TT3 ont été environ 25 % plus faibles dans le groupe traité au fipronil par rapport au groupe témoin à 14 jours de traitement. De même, les concentrations plasmatiques des hormones libres ont été significativement diminuées dans le groupe traité au fipronil. Le traitement au fipronil a également été associé à une augmentation des concentrations plasmatiques de TSH ($p < 0.05$). Il n'y a pas eu d'interaction significative entre l'effet traitement et l'effet période ($p > 0.27$ pour les concentrations totales et libres de HT et TSH) indiquant que l'effet du fipronil était déjà présent à 14 jours de traitement.

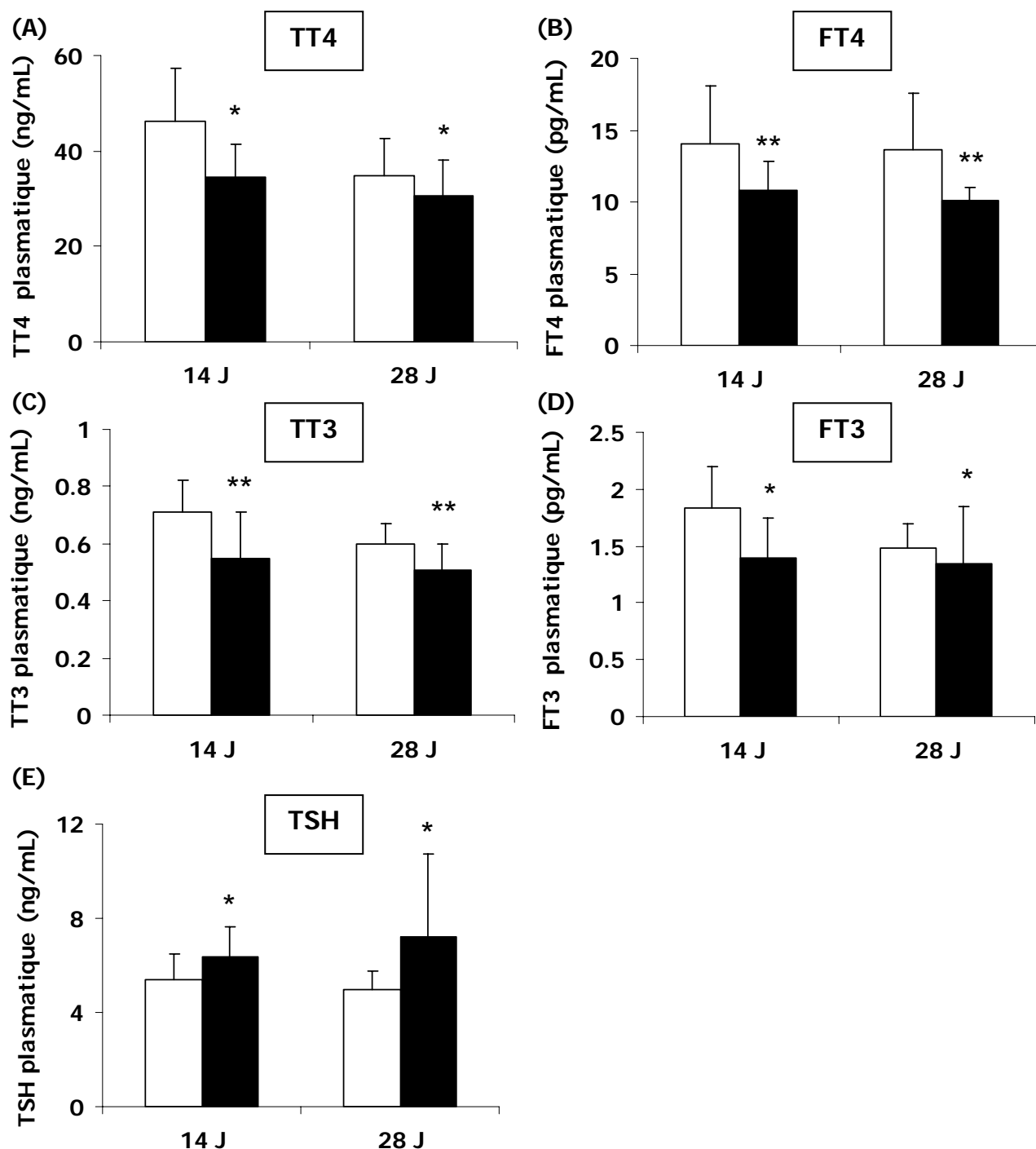


Figure 4 : Effet d'un traitement au fipronil à 14 et 28 jours sur les concentrations plasmatiques moyennes des HT et de TSH

Vingt huit rates, réparties en groupes de sept rates, ont été traitées par gavage avec de la solution témoin (□) ou du fipronil (■ ; 3 mg/kg/j, PO) pendant 14 ou 28 jours. Les concentrations plasmatiques moyennes de TT4 (A), FT4 (B), TT3 (C), FT3 (D) et TSH (E) de chaque groupe ont été mesurées dans des échantillons collectés 25 h après la dernière administration de fipronil. Significativement différent du témoin : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

3.3 Expérience 2 : effet du fipronil sur les paramètres PK de la T4

La figure 5 représente l'évolution des concentrations plasmatiques moyennes de FT4 et TT4 après une administration IP de T4 dans les groupes témoin et traité au fipronil. L'analyse visuelle des figures montre que les concentrations moyennes de FT4 et TT4 sont supérieures dans le groupe témoin pour tous les temps de la cinétique. Les paramètres PK estimés de FT4 et TT4 sont présentés dans le tableau 5. L'AUC, le $t_{1/2}$ et le C_{max} moyens de TT4 ont été significativement inférieurs ($p < 0.01$) dans le groupe traité au fipronil. Tmax n'a pas été modifié entre les deux groupes. En revanche, la clairance apparente de la T4 du groupe traité au fipronil a été doublée par rapport à celle du groupe témoin. Des résultats similaires ont été observés pour les paramètres PK de la FT4.

Les concentrations plasmatiques moyennes de TT3 mesurées le jour de la cinétique de T4 soit 5 h après l'injection SC de T3 et 4 h après l'administration IP de T4 étaient significativement inférieures dans le groupe traité au fipronil (1.4 ± 0.3 ng/mL vs. 0.9 ± 0.3 ng/mL respectivement pour les groupes témoin et traité au fipronil, $p < 0.01$).

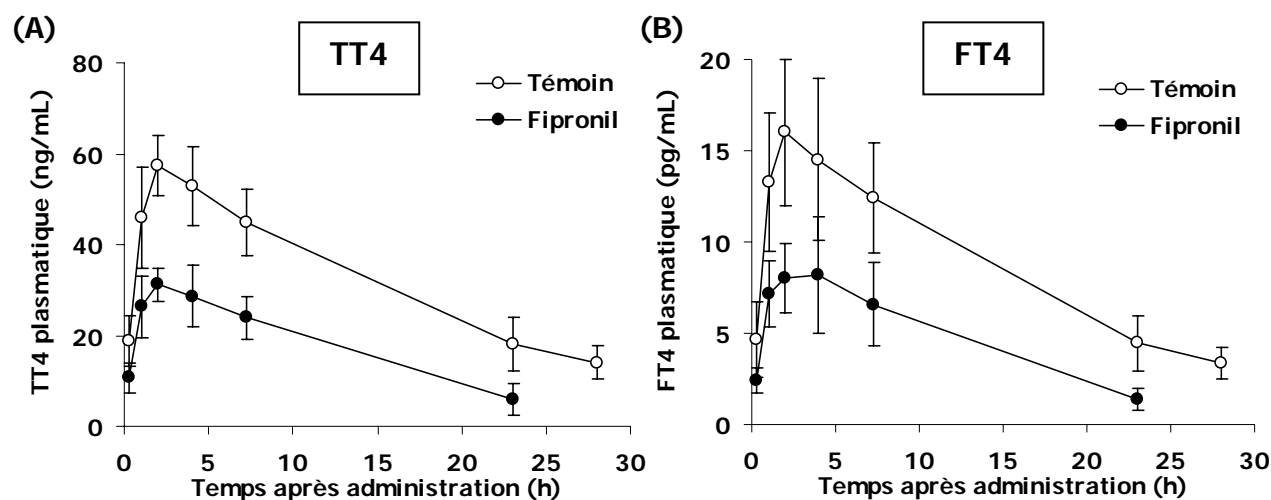


Figure 5 : Effet du fipronil sur l'évolution des concentrations plasmatiques moyennes de TT4 et FT4 au cours du temps

Des rates THX traitées à la T3 ($12 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$, SC) ont été traitées oralement avec de la solution témoin ($\text{--}\circ\text{--}$; $n=10$) ou du fipronil ($\text{--}\bullet\text{--}$; $3 \text{ mg}/\text{kg}/\text{j}$; $n=8$) pendant 14 jours. Le lendemain de la dernière administration de fipronil, les concentrations plasmatiques de FT4 et TT4 ont été déterminées dans des échantillons collectés 0.25, 1, 2, 4, 8, 23 et 28 h après une administration IP unique de T4 ($10 \mu\text{g}/\text{kg}$). (A) Concentrations plasmatiques de TT4 au cours du temps; (B) Concentrations plasmatiques de FT4 au cours du temps.

Tableau 5 : Effet du fipronil sur les paramètres PK moyens de TT4 et FT4

Paramètres PK TT4		
	Témoin n=10	Fipronil n=8
AUC (ng.h/mL)	1131 ± 263	459 ± 142 **
Clairance apparente (mL/min/kg)	0.16 ± 0.04	0.40 ± 0.13 **
t_{1/2} (h)	11.3 ± 2.4	7.6 ± 2.5 **
C_{max} (ng/mL)	58.9 ± 6.9	33.1 ± 4.1 **
T_{max} (h)	2.6 ± 0.7	2.4 ± 0.7

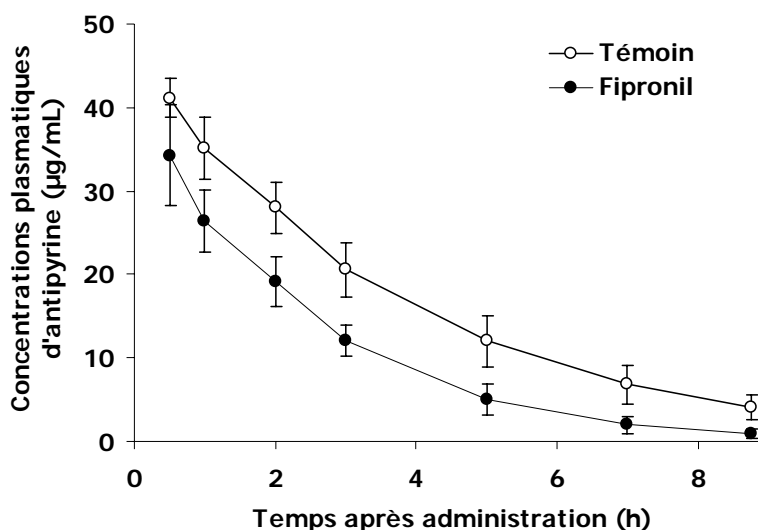
Paramètres PK FT4		
	Témoin n=10	Fipronil n=8
AUC (pg.h/mL)	287 ± 70	123 ± 42 **
Clairance apparente (mL/min/kg)	618 ± 170	1460 ± 389 **
t_{1/2} (h)	9.6 ± 1.8	6.8 ± 1.6 **
C_{max} (pg/mL)	16.7 ± 3.2	9.2 ± 2.1 **
T_{max} (h)	2.8 ± 0.7	2.8 ± 1.1

Des rates THX+T3 (12 µg/kg/j, SC) ont été traitées oralement avec de la solution témoin (n=10) ou du fipronil (3 mg/kg/j; n=8) pendant 14 jours. Le lendemain de la dernière administration de fipronil, les concentrations plasmatiques de FT4 et TT4 ont été déterminées dans des échantillons collectés 0.25, 1, 2, 4, 8, 23 et 28 h après une administration IP unique de T4 (10 µg/kg). Les paramètres PK de FT4 et TT4 ont été calculés avec un modèle monocompartimental avec une phase d'absorption d'ordre 1 pour chaque animal. Significativement différent du témoin : ** p < 0.01.

3.4 Expérience 3 : effet du fipronil sur les paramètres PK de l'antipyrine

La figure 6 représente l'évolution temporelle des concentrations plasmatiques moyennes d'antipyrine après une administration IP d'antipyrine dans les groupes témoin et traité au fipronil. L'analyse visuelle du graphique montre que les concentrations plasmatiques moyennes sont supérieures chez le groupe témoin pour tous les points de la cinétique. Les paramètres PK moyens de l'antipyrine pour chaque groupe sont présentés dans le tableau 6. L'AUC, le t_{1/2} et le C_{max} moyens de l'antipyrine ont été significativement inférieurs (p<0.01) dans le groupe traité au fipronil alors que la clairance apparente de l'antipyrine dans ce groupe était 1.7 fois supérieure à celle du groupe témoin.

Figure 6 : Effet du fipronil sur l'évolution des concentrations plasmatiques moyennes d'antipyrine



Des rates à thyroïde intacte ont été traitées oralement avec de la solution témoin (○; n=8) ou du fipronil (●; 3 mg/kg/d, po ; n=9) pendant 14 jours. Le lendemain de la dernière administration de fipronil, les concentrations plasmatiques d'antipyrine ont été déterminées dans des échantillons collectés 0.5, 1, 2, 3, 5, 7 et 9 h après une administration IP unique d'antipyrine (30 mg/kg).

Tableau 6 : Effet du fipronil sur les paramètres PK moyens d'antipyrine

	Témoin n=8	Fipronil n=9
AUC (µg.h/mL)	166 ± 28	95 ± 19 **
Clairance apparente (mL/min/kg)	3.1 ± 0.7	5.4 ± 1.0 **
t_{1/2} (h)	2.4 ± 0.5	1.5 ± 0.2 **
Cmax (µg/mL)	41.5 ± 2.5	35.6 ± 7.1 **

Les rates ont été traitées avec de la solution témoin (n=8) ou du fipronil (3 mg/kg/j, PO; n=9) pendant 14 jours. Le lendemain de la dernière administration de fipronil les concentrations plasmatiques d'antipyrine ont été déterminées dans des échantillons collectés 0.5, 1, 2, 3, 5, 7 et 9 h après une administration IP unique d'antipyrine (30 mg/kg). Les paramètres PK moyens d'antipyrine ont été calculés avec un modèle monocompartimental avec une phase d'absorption d'ordre 1 pour chaque animal. Significativement différent du témoin : ** p < 0.01.

3.5 Expérience 4 : effet du fipronil sur l'activité de glucuroconjugaison du 4-nitrophénol par les UDPGT

L'activité microsomale moyenne de glucuroconjugaison du 4-nitrophénol chez le groupe traité au fipronil était de 71 ± 13 vs. 56 ± 8 nmol/h/mg pour le groupe témoin montrant une augmentation significative de 27 % (p<0.01) de l'activité microsomale de glucuroconjugaison du 4-nitrophénol chez le groupe traité au fipronil.

4. DISCUSSION

Dans cette phase expérimentale, nous avons démontré que le fipronil diminue les concentrations plasmatiques de T4 en augmentant la clairance de la T4. Plus précisément, le fipronil à 3 mg/kg/j diminue les concentrations plasmatiques de TT4 et augmente celles de TSH ce qui est en accord avec les résultats décrits dans les études toxicologiques précédentes [147, 150]. Nous avons également montré que le fipronil diminue les concentrations plasmatiques des HT libres ainsi que celles de TT3 ce qui n'avait pas encore été observé jusqu'à présent. Nos résultats indiquent que la diminution des concentrations plasmatiques de FT4 et TT4 est associée à une augmentation de la clairance à la fois de FT4 et de TT4. De plus, il semblerait que le traitement au fipronil induise les enzymes hépatiques de phase I et de phase II comme en témoignent l'augmentation d'un facteur deux de la clairance de l'antipyrine *in vivo* et l'augmentation de l'activité microsomale de glucuroconjugaison du 4-nitrophénol par les UDPGT. De plus amples analyses, par exemple, l'identification et la quantification des ARNm des enzymes hépatiques potentiellement induites, sont nécessaires pour valider cette hypothèse et pour clairement identifier quelles sont les isoformes induites. Tous ces résultats sont compatibles avec le schéma physiopathologique d'action du fipronil proposé par les études toxicologiques précédentes. Dans cette partie expérimentale, et contrairement à ces premières évaluations toxicologiques, les effets du fipronil sur les concentrations plasmatiques et ceux sur la clairance de la T4 ayant été étudiés dans des conditions de traitement au fipronil homogènes, ceux-ci suggèrent fortement l'existence d'une relation de cause à effet entre l'augmentation de la clairance de la T4 et la diminution des concentrations plasmatiques de T4.

Les concentrations plasmatiques de TT3 des animaux témoins THX+T3 de l'expérience 2 ont été supérieures à celles des animaux témoins intacts de l'expérience 1. Cela s'expliquerait en partie par le fait que les concentrations plasmatiques de T3 des animaux THX+T3 ont été mesurées 4 h après administration de T4. Une partie de la T3 mesurée provient donc de la désiodation de la T4 en T3.

D'autre part, dans le modèle THX+T3, les concentrations plasmatiques de TT3 du groupe témoin ont été supérieures à celles du groupe traité au fipronil. Cette observation ainsi que la diminution des concentrations plasmatiques de T3 observée sur les animaux à thyroïde intacte traités au fipronil (expérience 1) suggèrent que le fipronil pourrait également augmenter la clairance de la T3.

Les données *in vitro* et *ex vivo* sur la capacité du fipronil à induire les enzymes hépatiques sont discordantes. Dans cette étude, nous avons évalué l'effet du fipronil sur l'activité globale des enzymes de phase I et des UDPGT impliquées dans la glucuroconjugaison de la T4. L'augmentation d'un facteur deux de la clairance apparente de l'antipyrine est compatible avec une augmentation de l'activité des CYP, dont certaines isoformes sont impliquées dans le métabolisme de l'antipyrine [172, 173]. Il est possible que cette augmentation d'activité soit due à une induction de l'expression des CYP comme cela a été démontré sur des hépatocytes humains dans lesquels le fipronil a induit à la fois l'expression et l'activité des isoformes CYP3A4 et 1A1 [148, 156].

L'effet du fipronil sur l'activité d'une partie des UDPGT responsables de la glucuroconjugaison de la T4 a été étudié en mesurant l'activité microsomale de glucuroconjugaison du 4-nitrophénol. Cette activité a été augmentée chez les rates traitées au fipronil suggérant une augmentation de l'activité des isoformes UDPGT1, en particulier l'isoforme 1A6 [174]. Cette augmentation modérée d'activité pourrait expliquer en partie l'augmentation de clairance de la T4 que nous avons mise en évidence et serait compatible avec l'augmentation de l'excrétion biliaire décrite dans les études toxicologiques [147, 150]. Cependant, la participation d'autres mécanismes d'élimination de la T4 tels que la sulfoconjugaison, la désiodation ou l'excrétion de T4 non conjuguée [175] ne peut être exclue.

Dans ces expériences, le traitement au fipronil a conduit à une exposition des animaux au fipronil sulfone bien plus importante que l'exposition au fipronil. Les concentrations plasmatiques de fipronil sulfone trouvées dans l'expérience 2 sont cohérentes avec celles observées dans l'expérience préliminaire (de l'ordre de 1500 ng/mL) ; celles des expériences 1, 3 et 4 sont quant à elles supérieures (entre environ 2500 et 3500 ng/mL). Cette différence est d'autant plus importante que les concentrations les plus élevées ont été observées dans les expériences où les prélèvements étaient effectués 25 h après l'administration de fipronil et que l'on aurait pu logiquement s'attendre à ce que ces valeurs soient plus faibles que celles des expériences où le prélèvement a été effectué 7 h après l'administration orale de fipronil. Cependant, les concentrations de fipronil sulfone de l'expérience 2 ne sont pas directement comparables à celles obtenues dans les autres expériences car les modèles expérimentaux sont différents (les rates de l'expérience 2 sont des rates THX+T3).

D'autre part, il semblerait que le fipronil induise sa propre métabolisation d'une part parce que les concentrations plasmatiques de fipronil diminuent au cours du traitement

jusqu'à devenir indétectables et d'autre part parce que la disparition de fipronil est plus rapide lors de la dernière administration de fipronil que lors de la première administration. De plus, les concentrations de fipronil sulfone diminuent dès cinq h post administration de la dernière dose de fipronil alors qu'elles n'ont fait qu'augmenter progressivement pendant les 24 h suivant la première administration de fipronil. Cela est d'autant plus probable que, sur des hépatocytes humains, le fipronil augmente l'expression et l'activité du CYP3A4 [148], principale isoforme impliquée dans la formation du fipronil sulfone chez l'homme [143]. La métabolisation de l'antipyrine est prise en charge par les CYP2C11/C6 dans les microsomes de foie de rats non traités au phénobarbital et par les CYP2B et 3A dans les microsomes de foie de rats traités au phénobarbital (40 mg/kg/j, PO, pendant trois jours) [172]. Nos résultats *in vivo* montrant une augmentation de la clairance de l'antipyrine confortent donc l'hypothèse d'une induction des systèmes enzymatiques hépatiques par le fipronil dont probablement ceux responsables de sa propre métabolisation.

La vitesse de formation du fipronil sulfone par les microsomes de rats est environ 4 fois supérieure à la vitesse de formation par les hépatocytes humains [143]. De plus, lors d'une exposition accidentelle au fipronil chez l'homme, le rapport des concentrations fipronil sulfone/fipronil à 24 h post ingestion est d'environ 0.25 à 0.5 [176]. Dans nos conditions expérimentales, ce rapport était de 2.5 et est probablement devenu supérieur à 100 après 14 jours de traitement chez le rat comme le suggèrent les résultats de la caractérisation de l'exposition au fipronil et au fipronil sulfone. Des différences quantitatives de métabolisme du fipronil existent donc entre les deux espèces. Il serait nécessaire de connaître la clairance du fipronil sulfone dans les deux espèces afin de s'assurer que les plus fortes concentrations de fipronil sulfone observées chez le rat ne sont pas plutôt dues à une élimination moins rapide du fipronil sulfone dans cette espèce. Quelle que soit l'explication, cette différence d'exposition au fipronil et à son métabolite pose le problème de la pertinence du modèle rat pour évaluer le risque de l'exposition humaine à cette substance.

En définitive, chez le rat, le traitement au fipronil conduit à une perturbation thyroïdienne caractérisée par une diminution des concentrations plasmatiques des HT suite à une forte augmentation de la clairance de la T4 et probablement de la T3. Cependant, la pertinence de ces résultats dans le contexte d'un risque pour l'homme n'est pas évidente dans la mesure où l'homme exprime la TBG ce qui n'est pas le cas du rat adulte et qu'il est probable que l'exposition au fipronil et au fipronil sulfone soit différente entre les deux espèces. Dans la deuxième partie de ce travail de thèse, nous nous proposons donc de réévaluer les effets et les mécanismes d'action du fipronil sur la fonction thyroïdienne dans

une espèce qui serait plus proche de l'homme que le rat en matière de régulation de la fonction thyroïdienne, notamment en ce qui concerne les protéines plasmatiques de liaison des HT. En outre, une attention particulière sera portée à la caractérisation de l'exposition au fipronil et à son principal métabolite le fipronil sulfone de façon à s'assurer que ce modèle est également pertinent par rapport à l'homme du point de vue du schéma d'exposition aux toxiques.

*EVALUATION TOXICOLOGIQUE
DU FIPRONIL
SUR LA FONCTION THYROIDIENNE
CHEZ LE MOUTON*

1. INTRODUCTION

Nous avons montré que l'exposition orale de rats au fipronil augmente la clairance de la T4 conduisant à des concentrations plasmatiques de T4 diminuées et des concentrations plasmatiques de TSH augmentées. Selon l'hypothèse communément admise sur le rôle protecteur de la TBG, la présence d'HT fortement liées à la TBG chez l'homme devrait permettre de compenser la perte accrue d'HT due à une augmentation du catabolisme hépatique et ainsi permettre le maintien de l'homéostasie thyroïdienne.

Le but de cette partie expérimentale était donc de réévaluer la toxicité du fipronil en tant que perturbateur thyroïdien dans l'espèce ovine qui exprime de façon permanente une TBG ayant des propriétés de liaison des HT proches de celle de l'homme. Cette similitude entre le mouton et l'homme peut être étendue aux autres protéines plasmatiques de liaison des HT, la TTR et l'albumine [78]. Ainsi, le mouton semble être un modèle approprié pour évaluer l'effet toxique de perturbateurs thyroïdiens potentiels pour l'homme.

Dans cette partie expérimentale, nous avons donc caractérisé les effets d'un traitement au fipronil sur le bilan thyroïdien de moutons. Nous avons ensuite déterminé si, comme chez le rat, le fipronil pouvait augmenter l'élimination de la T4 dans cette espèce. Nous avons par la suite évalué la capacité du fipronil à augmenter l'activité des CYP hépatiques responsables de l'élimination de l'antipyrine. Enfin, à l'aide de l'exposition au fipronil et au fipronil sulfone qui a été caractérisée dans chaque expérience, les résultats obtenus ont été analysés et mis en perspective par rapport à ce qui est connu de l'exposition au fipronil et au fipronil sulfone chez l'homme et le rat.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1 Etablissement d'un schéma posologique de traitement au fipronil chez le mouton : détermination des paramètres PK du fipronil chez la brebis

Dans cette partie expérimentale, deux types de traitements au fipronil ont été utilisés : un traitement PO et un traitement IV dont l'objectif était d'atteindre les concentrations plasmatiques de fipronil associées à la perturbation thyroïdienne chez le rat.

Lors de ces expériences sur les moutons, les seules données connues chez le rat étaient celles des concentrations plasmatiques de fipronil dosées par HPLC détection UV obtenues après un traitement au fipronil à 3 mg/kg/j pendant 14 jours, c'est-à-dire des concentrations inférieures à la LLOQ de 100 ng/mL. La concentration plasmatique de fipronil à atteindre chez le mouton à l'état d'équilibre a alors été arbitrairement fixée à 50 ng/mL.

L'équation PK suivante a été utilisée pour calculer la dose de fipronil à administrer par voie IV pour obtenir une concentration plasmatique de fipronil à l'état d'équilibre de 50 ng/mL :

$$D = CL \times C_{ss} \times P$$

avec D, la dose de fipronil à administrer IV (mg/kg), CL, la clairance du fipronil chez la brebis, C_{ss}, la concentration plasmatique de fipronil à l'état d'équilibre (50 ng/mL) et P, la période d'administration (= 24 h).

La clairance du fipronil a été préalablement évaluée chez deux brebis ayant reçu une administration IV de fipronil (1 mg/kg) dissous à 10 mg/mL dans une solution d'éthanol-eau (2/1, v/v). Les prélèvements sanguins ont été effectués 0.5, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 24, 48, 72, 96, 120, 144 et 192 h après l'administration de fipronil et les concentrations de fipronil et fipronil sulfone ont été mesurées par HPLC/MS/MS. Les paramètres PK, déterminés avec un modèle tricompartmental pour le fipronil et un modèle monocompartmental avec une phase d'absorption d'ordre 1 pour le fipronil sulfone, sont présentés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Paramètres PK moyens de fipronil et fipronil sulfone chez la brebis après une administration IV

Fipronil		Fipronil sulfone	
AUC (ng.h/mL)	2355	AUC (ng.h/mL)	19218
t_{1/2} (h)	49	t_{1/2} (h)	179
MRT (h)	34	t_{max} (h)	1.7
V_{ss} (mL/kg)	13070	C_{max} (ng/mL)	194
Clairance (mL/min/kg)	7.6		

Une dose de 1 mg/kg de fipronil a été administrée à deux brebis et les concentrations plasmatiques de fipronil et de fipronil sulfone ont été déterminées dans des échantillons collectés 0.5, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 24, 48, 72, 96, 120, 144 et 192 h après l'administration IV de fipronil. Pour chaque animal, les paramètres PK du fipronil et du fipronil sulfone ont été respectivement calculés avec un modèle tricompartmental et avec un modèle monocompartmental avec une phase d'absorption d'ordre 1.

A partir de la valeur de clairance du fipronil obtenue, la dose quotidienne de fipronil à administrer par voie IV pour atteindre des concentrations plasmatiques de fipronil voisines de 50 ng/mL à l'état d'équilibre a été calculée à 0.5 mg/kg.

Pour le traitement PO, une cinétique de fipronil administré PO sur deux brebis a permis de déterminer que la biodisponibilité du fipronil PO était d'environ 40 %. La fréquence d'administration ayant été fixée à quatre jours, la dose de fipronil à administrer tous les quatre jours était donc égale à $\frac{\text{Dose quotidienne IV} \times 4}{\text{biodisponibilité}}$ soit 5 mg/kg.

2.2 Expérience 1: effet du fipronil sur les concentrations plasmatiques des HT et de TSH

L'expérience a été réalisée sur 10 béliers de poids corporel moyen de 48 ± 8 kg. Ils ont été répartis aléatoirement en deux groupes : un groupe témoin (n=4) et un groupe traité au fipronil (n=6). Le groupe traité au fipronil a reçu 5 mg/kg de fipronil en suspension tous les 4 jours pendant un mois à l'aide d'une sonde naso-oesophagienne. Le groupe témoin a reçu un volume équivalent de solution témoin. Le volume administré aux animaux a été ajusté au dernier poids corporel mesuré. Des prélèvements de sang ont été effectués toutes les 3 h pendant 24 h à trois périodes différentes : une semaine avant, puis à quatre et 11 semaines de traitement au fipronil. Les prélèvements de sang nocturnes ont été faits sous lumière rouge afin d'éviter toute perturbation des rythmes photopériodiques hormonaux. Le traitement au fipronil a été poursuivi jusqu'à 14 semaines. Les concentrations plasmatiques de fipronil et de fipronil sulfone ont été déterminées dans des échantillons collectés 3, 5, 7,

9, 12, 24, 48, 72 et 96 h après la première et la dernière administration de fipronil ainsi que dans des prélèvements collectés juste avant chaque administration de fipronil.

2.3 Expérience 2: effet du fipronil sur les paramètres PK de T4 de brebis THX

Dans un premier temps, l'effet du fipronil sur la clairance de la T4 a été étudié dans un modèle de brebis THX afin de pouvoir s'affranchir de toute sécrétion endogène de T4. Neuf brebis THX depuis plusieurs mois ont été réparties dans un groupe témoin (n=4) et un groupe traité au fipronil (n=5). Le fipronil (0.5 mg/kg/j, IV), dissous dans de l'éthanol absolu, a été administré tous les jours *via* un cathéter mis à demeure dans la veine jugulaire gauche. Un volume équivalent d'éthanol absolu a été administré au groupe témoin représentant une dose de 20 mg/kg/j d'éthanol. Le cathéter a été rincé avec 5 mL de sérum physiologique suivi de 1 mL de sérum physiologique hépariné (50 IU/mL). Les paramètres PK de FT4 et TT4 ont été évalués une semaine avant et après 14 jours de traitement au fipronil en suivant l'évolution temporelle des concentrations plasmatiques de FT4 et TT4 après une administration IV unique de T4 (10 µg/kg). En parallèle, des prélèvements sanguins effectués 1, 2, 4, 8, 15, 30 min puis 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10 et 24 h après la première administration et jusqu'à deux mois après la dernière administration de fipronil ainsi que dans des prélèvements collectés juste avant chaque administration de fipronil ont servi à caractériser l'exposition au fipronil et au fipronil sulfone. Seule une partie de ces échantillons a été analysée.

Afin de vérifier qu'une augmentation de la clairance de la T4 pouvait être mise en évidence chez des moutons THX, un traitement au phénobarbital (40 mg/kg, IP, pendant quatre jours), molécule augmentant la clairance de la T4 chez le rat [52], a servi de témoin positif. L'effet de ce traitement sur les paramètres PK de T4 a été étudié quatre mois après la fin du traitement au fipronil sur les cinq brebis issues du groupe traité au fipronil. La cinétique de T4 a été réalisée 48 h après la dernière administration de phénobarbital dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment lors du traitement au fipronil.

2.4 Expérience 3: effet du fipronil sur les paramètres PK de T4 de brebis THX+T3

Les interactions entre le statut thyroïdien et le métabolisme hormonal et/ou des xénobiotiques évoquées dans la description du modèle THX+T3 (p.48) nous ont incités à reprendre l'expérience précédente dans un modèle plus physiologique, comparable à celui développé pour le rat. De plus, les mêmes modalités de traitement au fipronil que les béliers

ont été appliquées pour permettre la comparaison des effets potentiels observés sur les paramètres PK de T4 dans ce modèle à ceux observés sur les bilans thyroïdiens des béliers. L'effet du fipronil sur les paramètres PK de T4 a donc été étudié chez des brebis THX+T3 soumises aux mêmes conditions de traitement au fipronil que les béliers de l'expérience 1 (5 mg/kg tous les quatre jours, PO, pendant un mois).

Dix brebis, réparties aléatoirement en deux groupes de cinq brebis, ont été thyroïdectomisées et traitées à la T3 (1.5 µg/kg/j, SC) dès le lendemain de l'intervention chirurgicale. Le traitement au fipronil ou à la solution témoin a débuté trois semaines après la thyroïdectomie. Les paramètres PK de FT4 et TT4 ont été évalués une semaine avant et après un mois de traitement comme décrit dans le matériel et méthodes général. Les concentrations plasmatiques de fipronil et de fipronil sulfone ont été déterminées dans des échantillons collectés juste avant chaque administration de fipronil et 0.75, 1.25, 1.75, 2.25, 3, 4, 5 et 6 jours après la dernière administration de fipronil.

2.5 Expérience 4: effet du fipronil sur les paramètres PK de l'antipyrine

Pour déterminer si le fipronil pouvait augmenter *in vivo* l'activité des CYP chez le mouton, l'effet du fipronil sur les paramètres PK de l'antipyrine a été étudié. L'antipyrine est une molécule de référence souvent utilisée pour tester l'activité des CYP ainsi que l'intégrité du foie dans plusieurs espèces [173, 177, 178]. De plus, nous avons montré dans le chapitre précédent que le traitement au fipronil augmente la clairance de cette molécule chez le rat.

Pour cette expérience, des brebis à thyroïde intacte ont été traitées au fipronil dissous dans de l'éthanol absolu (0.5 mg/kg/j, IV, n=5) ou avec de l'éthanol seul (20 mg/kg/j, IV, n=5) pendant 14 jours, soit une durée de traitement suffisante pour induire une augmentation de la clairance de l'antipyrine chez le rat. Les paramètres PK de l'antipyrine ont été déterminés 24 h avant le début du traitement et 24 h après la dernière administration de fipronil en suivant la décroissance des concentrations plasmatiques d'antipyrine après une administration unique d'antipyrine (10 mg/kg, IV) dans des échantillons collectés 30 min et 0 min avant puis 5, 10, 20, 30 min et 1, 1.5, 2, 4, 6 et 8 h après l'administration de l'antipyrine.

L'absence d'effet du traitement au fipronil sur la clairance de l'antipyrine nous a conduits à tester la possibilité de mettre en évidence une augmentation de la clairance de l'antipyrine suite à une induction enzymatique hépatique chez le mouton. Un traitement au phénobarbital (40 mg/kg/j, IP, pendant quatre jours) servant de témoin positif [179] a été appliqué aux mêmes animaux que précédemment excepté deux contrôles, trois mois après la

fin du traitement au fipronil. Les cinétiques d'antipyrine ont été réalisées trois jours avant le début du traitement au phénobarbital et 48 h après la dernière administration de phénobarbital dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment.

Les concentrations plasmatiques de fipronil et de fipronil sulfone ont été déterminées dans des échantillons collectés 0.17, 0.5, 1, 2, 6, 8, 10, 24 et 30 h après la première administration de fipronil, juste avant une administration sur deux de fipronil (toutes les 48 h) et 0.17, 0.5, 1, 2, 6, 8, 10, 24 h et 2, 5, 7, 9 et 15 jours après la dernière administration de fipronil.

2.6 Analyses statistiques

Pour l'expérience 1, aucune variation nyctémérale des concentrations plasmatiques de TT4, TT3 et FT4 n'a été observée, ce qui nous a conduits à calculer les concentrations plasmatiques moyennes sur 24 h. L'effet du traitement au fipronil sur ces concentrations moyennes ainsi que sur les paramètres PK moyens de FT4, TT4 et de l'antipyrine, ont été analysés avec une ANOVA avec comme facteurs à effets fixes le traitement, la période (avant traitement et après une certaine durée de traitement), l'interaction traitement/période et le facteur animal niché dans le facteur traitement comme facteur à effets aléatoires. Ces analyses ont été réalisées avec le logiciel SYSTAT® (version 10, Chicago, IL, USA). L'effet du traitement au phénobarbital sur les paramètres PK moyens de FT4, TT4 et sur ceux de l'antipyrine a été analysé à l'aide d'un test *t* de Student. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes \pm ET.

3. RESULTATS

3.1 Expositions au fipronil et au fipronil sulfone

L'évolution temporelle des concentrations plasmatiques moyennes de fipronil et de fipronil sulfone pour chaque expérience est représentée par la figure 7. De manière générale, les concentrations plasmatiques de fipronil sulfone diminuent plus lentement que celles de fipronil à la fin du traitement au fipronil.

Les béliers et les brebis THX+T3, traités au fipronil PO, avaient des concentrations plasmatiques moyennes respectives de fipronil à l'état d'équilibre d'environ 375 ng/mL et 100 ng/mL. Le rapport de leurs concentrations plasmatiques moyennes de fipronil sulfone/fipronil à l'état d'équilibre était respectivement de 2.6 et 3.3.

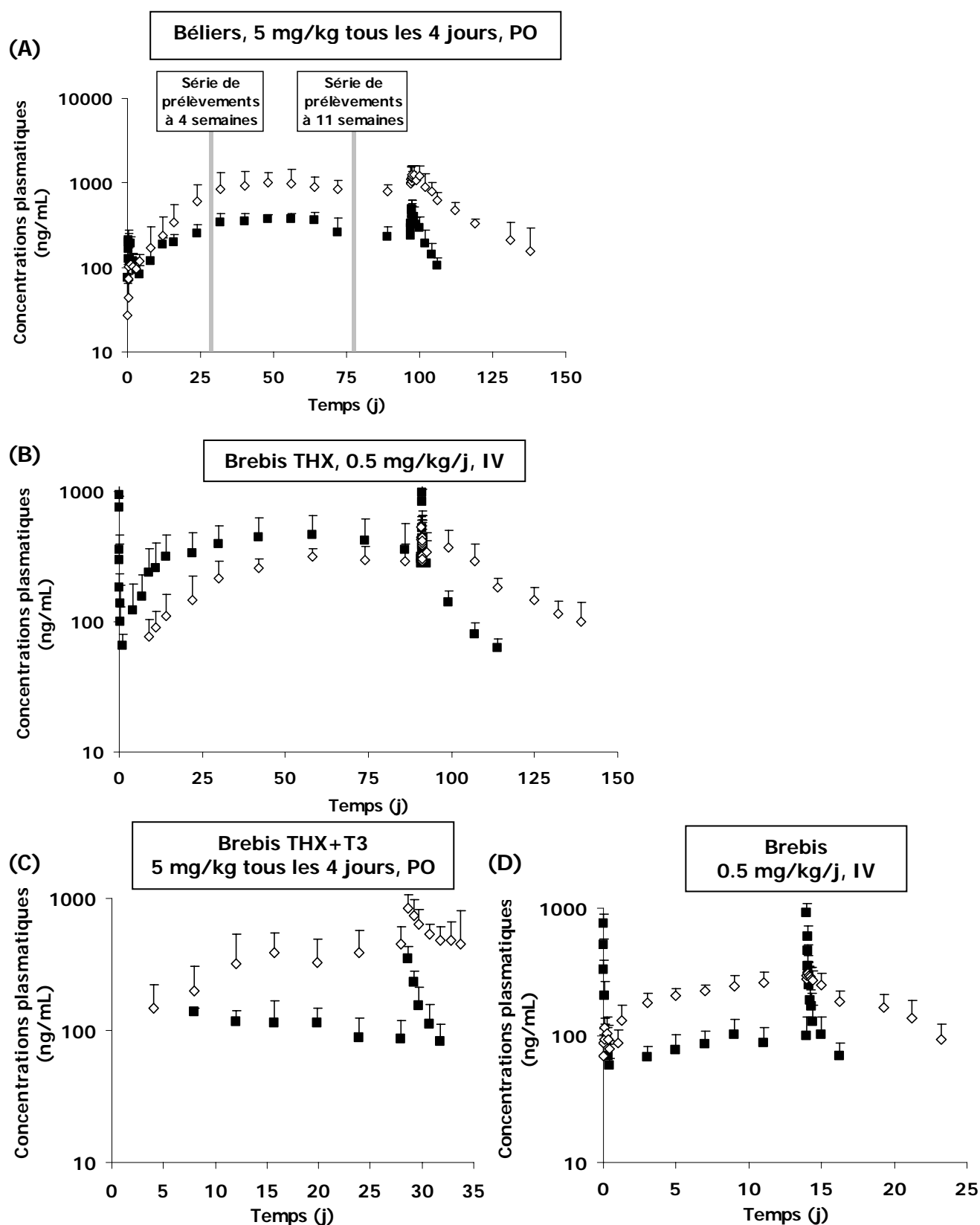


Figure 7 : Concentrations plasmatiques moyennes de fipronil et de fipronil sulfone dans chaque expérience

Les concentrations plasmatiques de fipronil (■) et de fipronil sulfone (◇) ont été suivies tout au long du traitement au fipronil chez les béliers (5 mg/kg tous les quatre jours, PO, pendant 11 semaines ; n=6) (A), chez des brebis THX (0.5 mg/kg/j, IV, pendant 90 jours ; n=5) (B), chez des brebis THX+T3 (5 mg/kg tous les quatre jours, PO, pendant quatre semaines ; n=5) (C) et chez des brebis à thyroïde intacte (0.5 mg/kg/j, IV, pendant 14 jours ; n=5) (D).

Les brebis THX et les brebis à thyroïde intacte, traitées par voie IV, avaient des concentrations plasmatiques moyennes respectives de fipronil à l'état d'équilibre autour de 385 ng/mL et 100 ng/mL. Le rapport de leurs concentrations plasmatiques moyennes de fipronil sulfone/fipronil à l'état d'équilibre était respectivement de 0.8 et 2. Un exemple représentatif de l'évolution temporelle des concentrations plasmatiques de fipronil observées et de celles obtenues à partir des différents modèles PK décrits dans le premier chapitre est représenté figure 8 pour chaque expérience. Les différents modèles permettent un bon ajustement entre les données expérimentales et celles estimées. Cet ajustement a permis d'évaluer les paramètres PK du fipronil pour chaque animal et de calculer les paramètres PK moyens pour chaque expérience, correspondant à un traitement au fipronil et un statut thyroïdien donné (tableau 8).

Concernant les animaux traités au fipronil PO, le Tmax des brebis THX+T3 était inférieur à celui des béliers, signe d'une absorption probablement plus rapide chez les brebis THX+T3. La clairance du fipronil des brebis THX+T3 était légèrement supérieure à celle des béliers, ce qui pourrait expliquer en partie le fait que leurs concentrations plasmatiques de fipronil étaient inférieures à celles des béliers à l'état d'équilibre.

Les clairances du fipronil administré par voie IV sont légèrement inférieures à celles du fipronil administré PO. La clairance du fipronil des brebis THX est elle-même inférieure à celle des brebis à thyroïde intacte ; bien que cette différence ne soit pas significative, les concentrations de fipronil des brebis THX à l'état d'équilibre sont supérieures à celles des brebis à thyroïde intacte.

De manière générale, les valeurs de clairance du fipronil sont du même ordre de grandeur entre les groupes. Le débit cardiaque d'un mouton étant de l'ordre de 3 à 5 L/min [180], la clairance du fipronil pour un mouton de 50 kg est d'environ 0.15 L/min, ce qui dénote une élimination lente de la molécule. Les brebis THX diffèrent le plus des autres groupes par le fait que leur clairance de fipronil est la plus faible et surtout que le rapport des concentrations plasmatiques de fipronil sulfone/fipronil à l'état d'équilibre est inférieur à 1 : c'est le seul groupe d'animaux dans lequel les concentrations plasmatiques de fipronil sont supérieures à celles de fipronil sulfone à l'état d'équilibre.

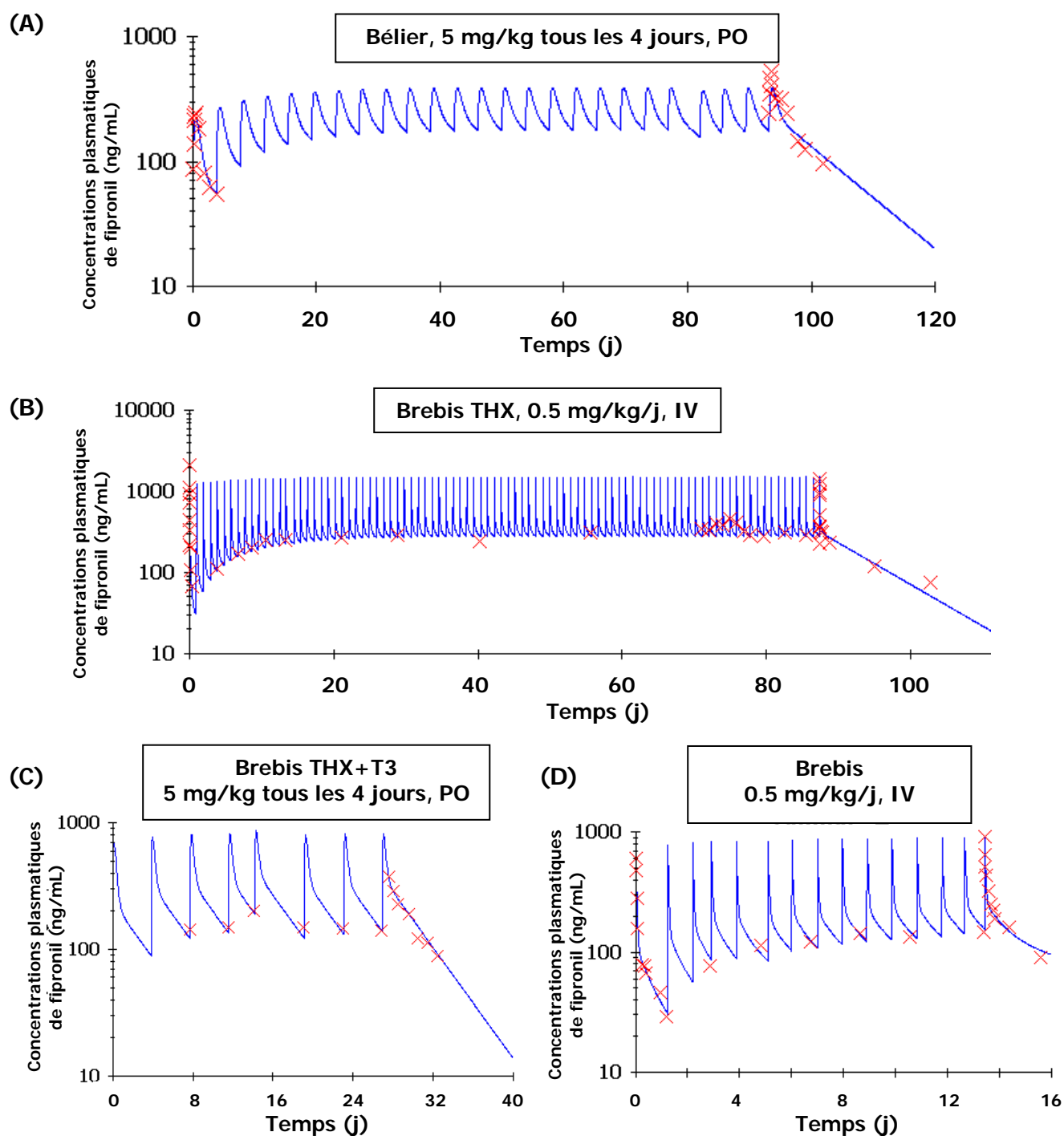


Figure 8 : Exemples représentatifs d'évolution temporelle des concentrations plasmatiques de fipronil expérimentales et de celles ajustées aux différents modèles PK

Evolution des concentrations plasmatiques de fipronil expérimentales (×) et de celles ajustées aux différents modèles PK (—) chez un bélier traité au fipronil à 5 mg/kg tous les quatre jours, PO, pendant 90 jours (A), une brebis THX+T3 traitée à 0.5 mg/kg/j, IV, pendant 90 jours (B), une brebis THX+T3 traitée à 5 mg/kg tous les quatre jours, PO, pendant 30 jours (C) et une brebis à thyroïde intacte traitée à 0.5 mg/kg/j, IV, pendant 15 jours (D).

Tableau 8 : Paramètres PK moyens de fipronil pour chaque expérience

Fipronil : 5 mg/kg tous les 4 jours, *per os*

	Béliers à thyroïde intacte (n=6)	Brebis THX+T3 (n=5)
Cmax (ng/mL)	209 ± 49	588 ± 220
Tmax (h)	17 ± 5	5 ± 2
AUC (ng.h/mL)	28893 ± 6906	20362 ± 5633
t_{1/2} (h)	132 ± 39	73 ± 10
CL (mL/min/kg)	3.0 ± 0.8	4.4 ± 1.2

Fipronil : 0.5 mg/kg/j, IV

	Brebis THX (n=5)	Brebis à thyroïde intacte (n=5)
Cmax (ng/mL)	3060 ± 1402	983 ± 215
AUC (ng.h/mL)	5384 ± 2005	3910 ± 920
t_{1/2} (h)	51 ± 30	53 ± 33
CL (mL/min/kg)	1.7 ± 0.7	2.2 ± 0.5
MRT (h)	64 ± 39	49 ± 32
Vss (mL/kg)	4803 ± 2067	6001 ± 2564

Les concentrations plasmatiques de fipronil ont été suivies tout au long de chaque expérience. Quand le fipronil a été administré PO (expériences 1 et 3) les paramètres PK du fipronil ont été déterminés avec un modèle bicompartimental avec une phase d'absorption d'ordre 1. Quand le fipronil a été administré par voie IV (expériences 2 et 4), les paramètres PK du fipronil ont été déterminés avec un modèle tricompartmental pour chaque animal.

3.2 Expérience 1: effet du fipronil sur les concentrations plasmatiques des HT et de TSH

La figure 9 montre les concentrations plasmatiques moyennes sur 24 h de TT4, TT3 et FT4 dans le groupe témoin et celui traité au fipronil avant le traitement et à quatre et 11 semaines de traitement. Excepté un effet période significatif pour les concentrations plasmatiques de FT4, les effets traitement, période et leur interaction n'étaient significatifs pour aucune des HT. Les concentrations plasmatiques de TSH sont restées inférieures à la limite de détection du dosage (0.5 ng/mL) tout au long de l'expérience.

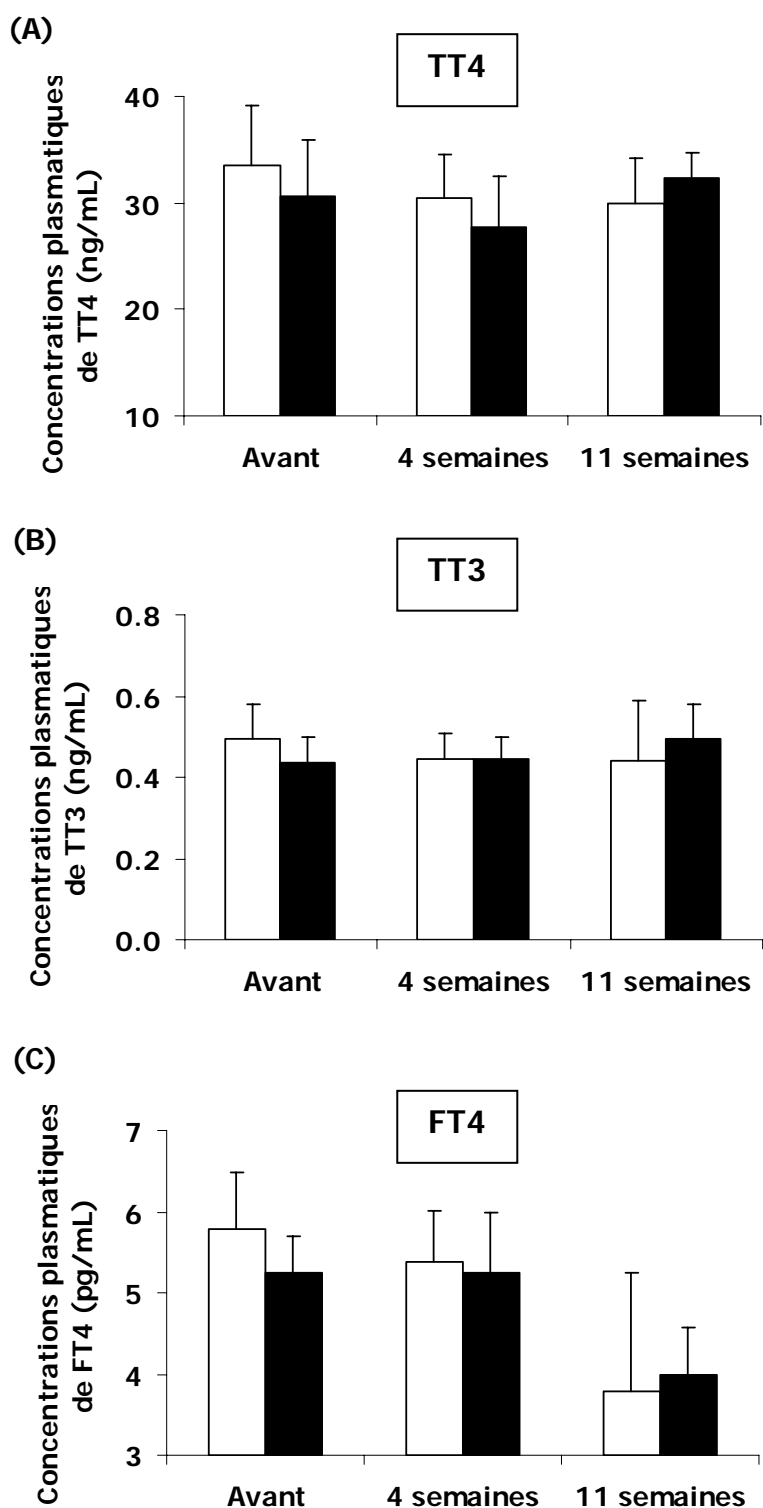


Figure 9 : Effet du traitement au fipronil sur les concentrations plasmatiques moyennes sur 24 h de TT4, TT3 et FT4 chez des béliers

Des groupes de quatre béliers témoins (□) et six béliers traités au fipronil (■) ont été traités avec une solution témoin ou du fipronil (5 mg/kg tous les quatre jours, PO). Les concentrations plasmatiques de TT4 (A), TT3 (B) et FT4 (C) ont été mesurées dans des prélèvements collectés toutes les 3 h pendant 24 h avant le début du traitement puis à quatre et 11 semaines de traitement.

3.3 Expérience 2: effet du fipronil sur les paramètres PK de T4 de brebis THX

L'évolution des concentrations plasmatiques moyennes de TT4 suite à une administration unique de T4 exogène a évolué de façon similaire au cours du temps avant et après traitement, que ce soit pour le groupe témoin ou le groupe traité au fipronil (figures 10 A et B). Les paramètres PK de TT4 estimés ont été similaires entre les deux groupes avant traitement et n'ont pas été modifiés par le traitement (tableau 9). En revanche, le traitement au phénobarbital a induit une décroissance plus rapide des concentrations plasmatiques moyennes de TT4 suite à une administration unique de T4 exogène (figure 10 A). Les paramètres PK moyens MRT, $t_{1/2}$ et AUC ont été significativement inférieurs après le traitement au phénobarbital par rapport à ceux après le traitement au fipronil (tableau 9). La clairance de TT4 a été multipliée par 1.5 alors que le V_{ss} est resté constant. Les mêmes résultats ont été observés pour la FT4 (figures 10 C et D) excepté que le $t_{1/2}$ n'a pas été modifié et que la clairance de FT4 a été multipliée par 1.7.

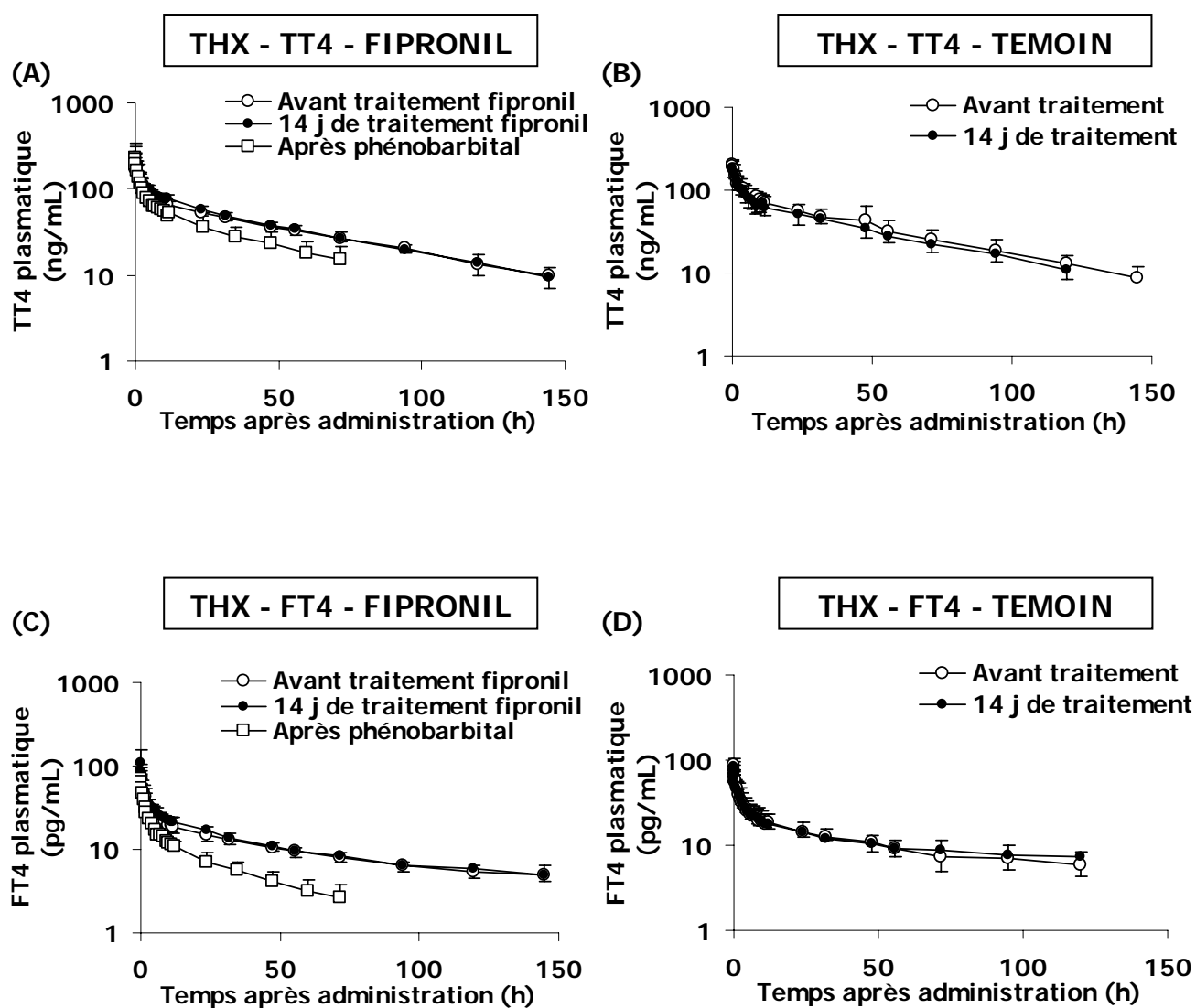


Figure 10 : Effet du fipronil et du phénobarbital sur la décroissance des concentrations plasmatiques moyennes de TT4 et FT4 chez des brebis THX

Des brebis THX ont été traitées à l'éthanol (groupe témoin, 20 mg/kg/j, n=4) ou au fipronil (0.5 mg/kg/j, IV ; n=5). Les concentrations plasmatiques de TT4 (groupe traité au fipronil (A), groupe témoin (B)) et de FT4 (groupe traité au fipronil (C), groupe témoin (D)) ont été déterminées dans des échantillons collectés 1, 2, 4, 8, 15, 30 min et 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 24, 48, 72, 96, 120 et 144 h après une administration IV unique de T4 (10 µg/kg) avant et à 14 jours de traitement au fipronil.

Quatre mois après la fin du traitement au fipronil, les brebis ayant été traitées au fipronil ont été traitées au phénobarbital (40 mg/kg/j, IP, pendant quatre jours) et les concentrations de TT4 (figure (A), -□-) et FT4 (figure (C), -□-) ont été suivies 48 h après la dernière administration de phénobarbital dans les mêmes conditions que celles précédemment décrites.

Tableau 9 : Effet du fipronil et du phénobarbital sur les paramètres PK moyens de TT4 et FT4 chez la brebis THX

Paramètres PK TT4

	Témoin (n=4)		Fipronil (n=5)		Après traitement au phénobarbital (n=5)
	Avant traitement	14 jours de traitement	Avant traitement	14 jours de traitement	
AUC (ng.h/mL)	5610 ± 1267	5137 ± 762	5498 ± 640	5907 ± 630	3482 ± 613 **
Clairance (mL/min/kg)	0.031 ± 0.007	0.028 ± 0.003	0.031 ± 0.004	0.033 ± 0.005	0.049 ± 0.011 **
t_{1/2} (h)	55 ± 23	49 ± 7	49 ± 6	49 ± 9	35 ± 9 *
MRT (h)	66 ± 13	65 ± 11	67 ± 8	66 ± 12	46 ± 13 *
Vss (L/kg)	0.13 ± 0.05	0.13 ± 0.02	0.12 ± 0.02	0.11 ± 0.01	0.13 ± 0.02

Paramètres PK FT4

	Témoin (n=4)		Fipronil (n=5)		Après traitement au phénobarbital (n=5)
	Avant traitement	14 jours de traitement	Avant traitement	14 jours de traitement	
AUC (pg.h/mL)	947 ± 222	920 ± 204	1161 ± 177	1184 ± 100	730 ± 150 **
Clairance (mL/min/kg)	186 ± 54	189 ± 50	147 ± 24	142 ± 13	237 ± 50 **
t_{1/2} (h)	35 ± 8	40 ± 7	41 ± 8	41 ± 3	33 ± 10
MRT (h)	46 ± 10	51 ± 6	54 ± 10	54 ± 6	41 ± 13 *
Vss (L/kg)	489 ± 53	583 ± 213	467 ± 50	457 ± 37	556 ± 114

Des brebis THX ont été traitées à l'éthanol (groupe témoin, 20 mg/kg/j, n=4) ou au fipronil (0.5 mg/kg/j, IV ; n=5). Les concentrations plasmatiques de TT4 et de FT4 ont été déterminées dans des échantillons collectés 1, 2, 4, 8, 15, 30 min et 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 24, 48, 72, 96, 120 et 144 h après une administration IV unique de T4 (10 µg/kg) avant et à 14 jours de traitement.

Quatre mois après la fin du traitement au fipronil, les brebis ayant été traitées au fipronil ont été traitées au phénobarbital (40 mg/kg/j, IP, pendant quatre jours) et les concentrations de TT4 et FT4 ont été suivies 48 h après la dernière administration de phénobarbital dans les mêmes conditions que précédemment décrit. Les paramètres PK de TT4 et FT4 ont été calculés avec un modèle tricompartmental pour chaque animal.

Significativement différent de 14 jours de traitement au fipronil : * p < 0.05, ** p < 0.01

3.4 Expérience 3: effet du fipronil sur les paramètres PK de T4 de brebis THX+T3

Les concentrations moyennes de TT3 avant traitement étaient respectivement de 0.6 ± 0.1 et 0.7 ± 0.2 ng/mL pour le groupe témoin et le groupe traité au fipronil. Ces concentrations ont atteint respectivement 1.0 ± 0.2 et 1.2 ± 0.4 ng/mL pour le groupe témoin et le groupe traité au fipronil à la fin du traitement. L'analyse statistique des concentrations plasmatiques de T3 a montré un effet de la période ($p=0.0002$) mais pas d'effet du traitement au fipronil ($p=0.67$).

Un effet période significatif a été mis en évidence pour l'AUC, le MRT, la CL et le $t_{1/2}$ ($p \leq 0.012$) à la fois pour les paramètres PK de FT4 et TT4. Cela s'est notamment traduit par une diminution plus rapide des concentrations plasmatiques moyennes de TT4 (figure 11) à un mois de traitement ainsi qu'une diminution de l'AUC, MRT et $t_{1/2}$ (tableau 10), à la fois chez le groupe témoin et le groupe traité au fipronil. De plus, une interaction traitement/période significative a été détectée pour la clairance de FT4 ($p=0.01$) indiquant une augmentation significative de la clairance de FT4 chez le groupe traité au fipronil.

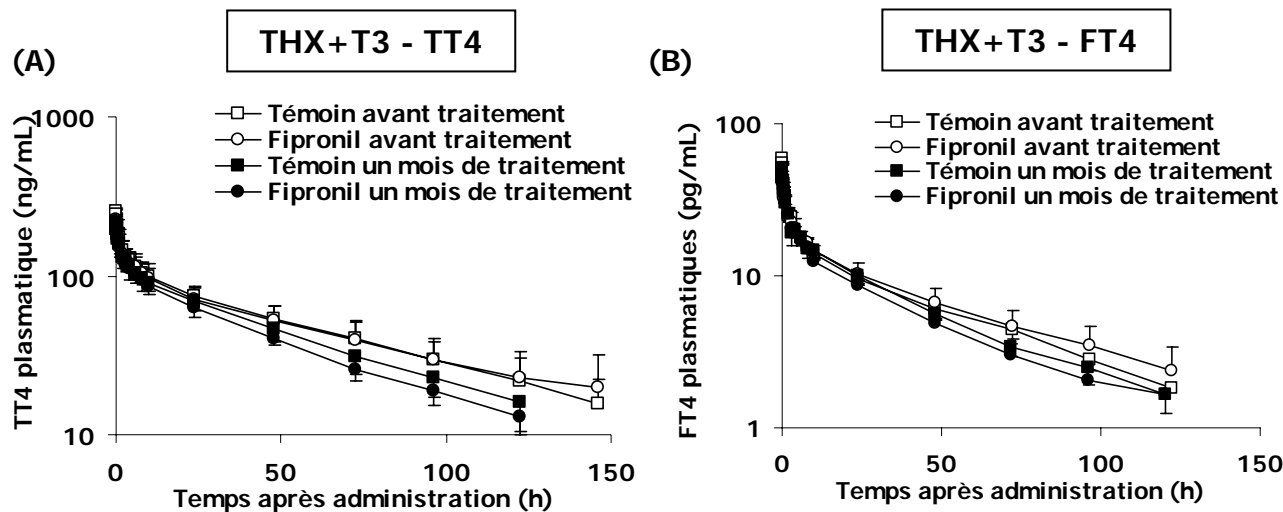


Figure 11 : Effet du fipronil sur la décroissance des concentrations plasmatiques moyennes de TT4 et FT4 chez des brebis THX+T3

Des brebis THX traitées à la T3 ($1.5 \mu\text{g/kg/j}$, SC) ont également été traitées avec une solution témoin ($n=5$) ou au fipronil (5 mg/kg tous les quatre jours, PO ; $n=5$). Les concentrations plasmatiques de TT4 (figure A) et de FT4 (figure B) ont été déterminées dans des échantillons collectés 1, 2, 4, 8, 15, 30 min et 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 24, 48, 72, 96, 120, 144 et 168 h après une administration IV unique de T4 ($10 \mu\text{g/kg}$) avant et à un mois de traitement.

Tableau 10 : Effet du fipronil sur les paramètres PK moyens de TT4 et FT4 chez des brebis THX+T3

Paramètres PK TT4

	Témoïn (n=5)		Fipronil (n=5)	
	Avant traitement	Un mois de traitement	Avant traitement	Un mois de traitement
AUC (ng.h/mL)	8460 ± 2147 ^a	6742 ± 1311 ^a	8821 ± 3234 ^a	5890 ± 805 ^a
Clairance (mL/min/kg)	0.021 ± 0.006 ^a	0.025 ± 0.006 ^a	0.021 ± 0.007 ^a	0.028 ± 0.005 ^a
t_{1/2} (h)	55 ± 10 ^a	46 ± 7 ^a	65 ± 23 ^a	43 ± 6 ^a
MRT (h)	76 ± 14 ^a	63 ± 10 ^a	87 ± 27 ^a	58 ± 7 ^a
Vss (L/kg)	0.091 ± 0.007	0.092 ± 0.007	0.101 ± 0.010	0.097 ± 0.009

Paramètres PK FT4

	Témoïn (n=5)		Fipronil (n=5)	
	Avant traitement	Un mois de traitement	Avant traitement	Un mois de traitement
AUC (pg.h/mL)	955 ± 129 ^a	883 ± 92 ^a	1086 ± 279 ^a	776 ± 88 ^a
Clairance (mL/min/kg)	177 ± 23 ^{a, b}	185 ± 13 ^{a, b}	160 ± 33 ^{a, b}	213 ± 30 ^{a, b}
t_{1/2} (h)	44 ± 7 ^a	36 ± 3 ^a	52 ± 13 ^a	38 ± 8 ^a
MRT (h)	57 ± 9 ^a	48 ± 5 ^a	67 ± 16 ^a	47 ± 8 ^a
Vss (L/kg)	596 ± 67	533 ± 35	621 ± 90	595 ± 24

Des brebis THX traitées à la T3 (1.5 µg/kg/j, SC) ont également été traitées avec une solution témoin (n=5) ou avec du fipronil (5 mg/kg tous les quatre jours, PO ; n=5). Les concentrations plasmatiques de TT4 (figure A) et de FT4 (figure B) ont été déterminées dans des échantillons collectés 1, 2, 4, 8, 15, 30 min et 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 24, 48, 72, 96, 120, 144 et 168 h après une administration IV unique de T4 (10 µg/kg) avant et à un mois de traitement. Les paramètres PK de TT4 et FT4 ont été calculés avec un modèle tricompartmental pour chaque animal.

^a Effet période significatif (p≤0.012) ; ^b Interaction traitement/période significative (p=0.01)

Expérience 4: effet du fipronil sur les paramètres PK de l'antipyrine

La décroissance des concentrations plasmatiques moyennes d'antipyrine a été similaire entre les deux périodes pour les deux groupes (figures 12 A et B). Les paramètres PK moyens d'antipyrine chez le groupe témoin et le groupe traité au fipronil (tableau 11) n'ont pas varié significativement entre les deux périodes.

En revanche, les concentrations moyennes d'antipyrine ont diminué plus rapidement après le traitement au phénobarbital (figure 12 C). L'AUC, le $t_{1/2}$ et le MRT après le traitement au phénobarbital ont été significativement inférieurs à ceux avant traitement. La clairance de l'antipyrine a été multipliée par 2.6 alors que le V_{ss} n'a pas été modifié (tableau 12).

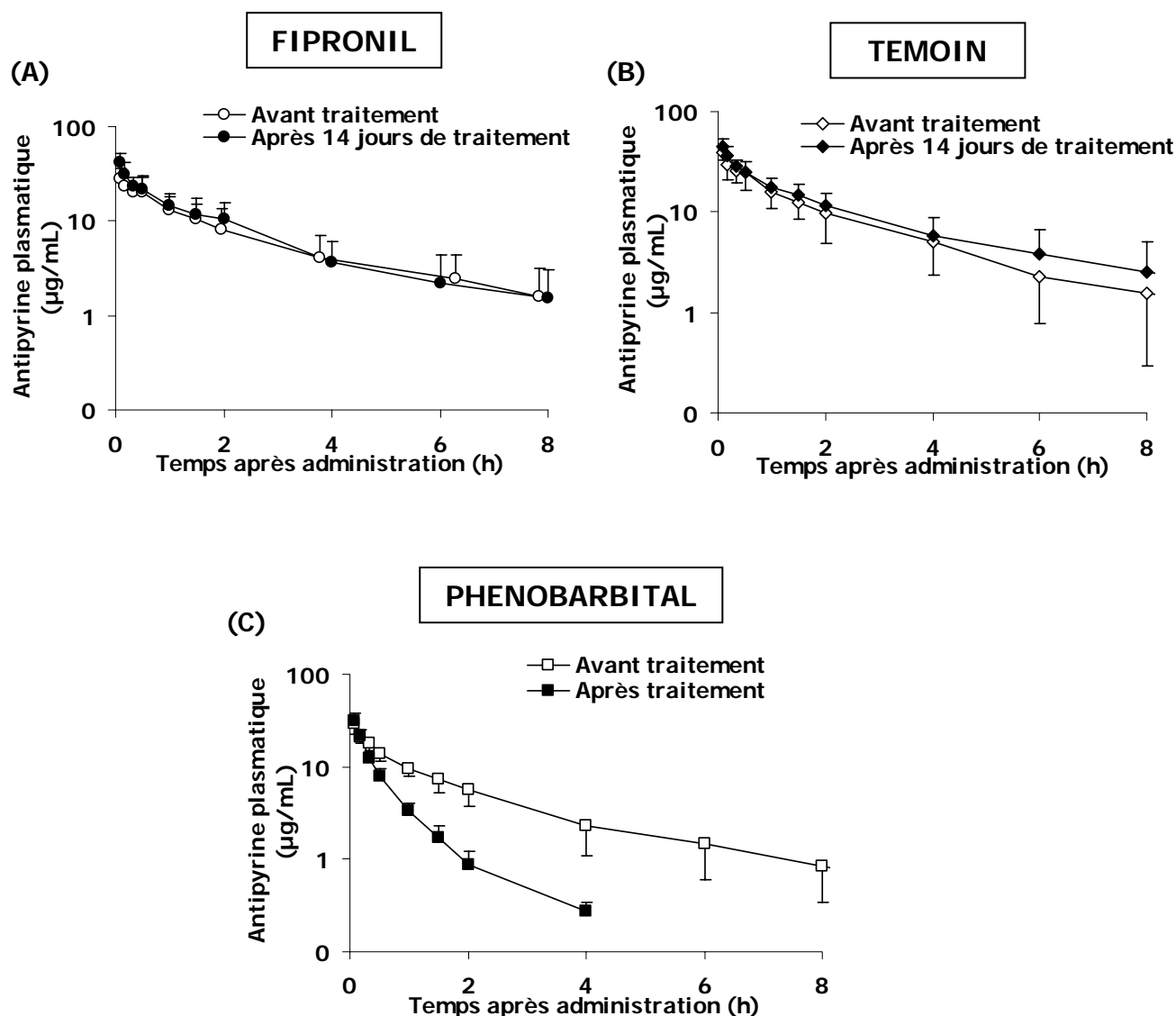


Figure 12 : Effet du fipronil et du phénobarbital sur la décroissance des concentrations plasmatiques moyennes d'antipyrine chez des brebis à thyroïde intacte

De l'éthanol (20 mg/kg/j) ou du fipronil dissous dans l'éthanol (0.5 mg/kg/j, IV) ont été administrés à des brebis à thyroïde intacte témoins (n=5) ou traitées au fipronil (n=5). Les concentrations plasmatiques d'antipyrine chez le groupe témoin (figure B) et chez les brebis traitées au fipronil (figure A) ont été déterminées dans des échantillons collectés 5, 10, 20, 30 min et 1, 1.5, 2, 4, 6 et 8 h après une administration IV unique d'antipyrine (10 mg/kg) avant et à 14 jours de traitement. Trois mois après la fin du traitement au fipronil, les brebis (n=8) ont été traitées au phénobarbital (40 mg/kg/j, IP, pendant quatre jours) et la décroissance des concentrations plasmatiques d'antipyrine a été suivie 3 jours avant et 48 h après le traitement au phénobarbital dans les mêmes conditions que décrites précédemment (figure C).

Tableau 11 : Effet du fipronil sur les paramètres PK moyens d'antipyrine chez des brebis à thyroïde intacte

	Témoïn (n=5)		Fipronil (n=5)	
	Avant traitement	Après 14 jours de traitement	Avant traitement	Après 14 jours de traitement
AUC (µg.h/mL)	63 ± 39	66 ± 34	61 ± 15	83 ± 42
Clairance (mL/min/kg)	3.5 ± 1.7	3.1 ± 1.4	2.9 ± 0.7	2.4 ± 1.1
t_{1/2} (h)	4.6 ± 2.4	2.3 ± 1.3	3.2 ± 1.2	3.4 ± 1.1
MRT (h)	3.8 ± 2.1	2.8 ± 1.5	3.1 ± 0.7	3.9 ± 1.8
Vss (mL/kg)	638 ± 153	437 ± 95	527 ± 154	503 ± 173

De l'éthanol (20 mg/kg/j) ou du fipronil dissous dans l'éthanol (0.5 mg/kg/j, IV) ont été administrés à des brebis à thyroïde intacte témoins (n=5) ou traitées au fipronil (n=5). Les concentrations plasmatiques d'antipyrine ont été déterminées dans des échantillons collectés 5, 10, 20, 30 min et 1, 1.5, 2, 4, 6 et 8 h après une administration IV unique d'antipyrine (10 mg/kg) avant et à 14 jours de traitement. Les paramètres PK d'antipyrine ont été calculés avec un modèle bicompartimental pour chaque animal.

Tableau 12 : Effet du phénobarbital sur les paramètres PK moyens d'antipyrine chez des brebis à thyroïde intacte

	Avant traitement au phénobarbital (n=8)	Après traitement au phénobarbital (n=8)
AUC (µg.h/mL)	39 ± 11	14 ± 3 **
Clairance (mL/min/kg)	4.6 ± 1.4	12.1 ± 2.4 **
t_{1/2} (h)	2.1 ± 0.6	0.8 ± 0.4 **
MRT (h)	2.4 ± 0.9	0.9 ± 0.2 **
Vss (mL/kg)	590 ± 134	479 ± 88

Trois mois après la fin du traitement au fipronil, les brebis (n=8) ont été traitées au phénobarbital (40 mg/kg/j, IP, pendant quatre jours) et les concentrations plasmatiques d'antipyrine ont été déterminées dans des échantillons collectés 5, 10, 20, 30 min et 1, 1.5, 2, 4, 6 et 8 h après une administration IV unique d'antipyrine (10 mg/kg) 3 jours avant et 48 h après le traitement au phénobarbital. Les paramètres PK d'antipyrine ont été calculés avec un modèle bicompartimental pour chaque animal. Significativement différent d'avant le traitement au phénobarbital : ** p < 0.01

4. DISCUSSION

Dans cette partie expérimentale, aucun effet du traitement au fipronil n'a été observé sur les concentrations plasmatiques moyennes sur 24 h de TT4, FT4 et TT3 chez les béliers. Cela suggère que le fipronil, un insecticide agissant comme un perturbateur thyroïdien chez le rat, n'aurait pas d'effet perturbateur sur les concentrations plasmatiques des HT chez le mouton. Ce résultat est compatible avec l'hypothèse selon laquelle les espèces exprimant la TBG seraient moins sensibles aux effets d'un perturbateur thyroïdien. En ce qui concerne l'exposition au fipronil et au fipronil sulfone, les béliers ayant reçu une administration orale de fipronil ont un rapport des concentrations plasmatiques de fipronil sulfone/fipronil de 0.6, 24 h après la première administration. Après ingestion accidentelle de fipronil, ce rapport à 24 h post ingestion chez l'homme était compris entre 0.25 et 0.5 [176]. Ces données suggèrent que le modèle ovin serait pertinent vis-à-vis de l'homme non seulement en termes de régulation de la fonction thyroïdienne mais également en termes d'exposition au fipronil et à son métabolite.

L'absence d'effet du fipronil sur les concentrations plasmatiques des HT ne permettait cependant pas d'écarter la possibilité de la mise en place d'un phénomène de compensation consistant en une augmentation de synthèse des HT en réponse à une possible augmentation de l'élimination des HT par le fipronil. L'effet du fipronil sur la clairance de la T4 devait donc être évalué. Pour cela, nous avons tout d'abord utilisé un modèle de brebis THX. Dans ce modèle, le fipronil n'a eu aucun effet sur les clairances de FT4 et TT4. Ce résultat nous a conduits à tester la possibilité de mettre en évidence une augmentation de la clairance de la T4 suite à une induction enzymatique dans ce modèle. Après traitement au phénobarbital, une molécule connue pour augmenter la clairance de la T4 dans d'autres espèces [52, 100], une augmentation des clairances de FT4 et TT4 a effectivement été mise en évidence.

Par ailleurs, les concentrations plasmatiques moyennes de fipronil et de fipronil sulfone chez les brebis THX étaient respectivement de 396 ± 150 et 215 ± 79 ng/mL à quatre semaines de traitement contre respectivement 188 ± 35 et 237 ± 157 ng/mL chez les béliers. Cette différence d'exposition au fipronil ainsi que l'absence d'effet du fipronil sur les paramètres PK de la T4 nous ont conduits à évaluer l'effet du fipronil sur les clairances de FT4 et TT4 à l'aide du modèle THX+T3 développé chez le rat dans des conditions de traitement au fipronil similaires aux béliers. En effet, le modèle THX+T3 permet de reproduire des concentrations plasmatiques de T3 proches des concentrations physiologiques et donc de ne pas modifier le métabolisme du fipronil, l'activité et l'expression des CYP étant

en partie régulées par la T3 [157, 181]. Nous avons appliqué aux brebis THX+T3 les mêmes conditions de traitement au fipronil que celles des béliers et avons déterminé les clairances de FT4 et TT4 après la même durée de traitement. Dans ce modèle, l'analyse statistique des paramètres PK moyens de TT4 et FT4 a montré un effet significatif de la période de traitement, ce qui indique que les paramètres PK moyens de T4 ont varié (augmentation de la clairance, diminution des AUC et de $t_{1/2}$) pendant l'expérience de façon similaire entre le groupe témoin et le groupe traité au fipronil. Le statut thyroïdien, et notamment la T3, peut modifier le métabolisme des HT chez le rat et le chat [162, 182]. Ces variations des paramètres PK moyens de T4 pourraient donc être expliquées par l'augmentation des concentrations plasmatiques de TT3 au cours de l'expérience. D'autre part, il a été observé une augmentation modérée mais significative de la clairance de FT4 chez le groupe traité au fipronil. Ce résultat suggère que la mesure des paramètres PK de la fraction libre des HT pourrait être un marqueur plus sensible de détection des effets d'un perturbateur thyroïdien potentiel.

Chez le rat, le fipronil conduit à une augmentation de la clairance de l'antipyrine, signe d'une augmentation de l'activité des CYP hépatiques. Nous avons testé si chez le mouton, le fipronil pouvait augmenter l'activité de systèmes enzymatiques hépatiques autres que ceux impliqués dans l'élimination de la T4. L'effet du fipronil sur les paramètres PK de l'antipyrine a été évalué lors d'un traitement au fipronil de 14 jours sur des brebis à thyroïde intacte. La valeur de la clairance de l'antipyrine observée était du même ordre de grandeur que celle décrite dans la littérature [183] et le traitement au fipronil n'a eu d'effet sur aucun des paramètres PK de l'antipyrine. En revanche, le phénobarbital utilisé comme témoin positif [179] a multiplié la clairance de l'antipyrine par 2.6, probablement par une induction des enzymes hépatiques responsables du catabolisme de l'antipyrine. Nos résultats suggèrent donc qu'il est peu probable que le fipronil, dans nos conditions expérimentales d'exposition, induise les systèmes enzymatiques hépatiques impliqués dans le catabolisme hépatique de l'antipyrine chez le mouton. La différence interspécifique des effets du fipronil sur le métabolisme de la T4 et de l'antipyrine ne nous permet pas de conclure sur un éventuel rôle protecteur de la TBG face à une augmentation de l'élimination de la T4.

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer l'absence d'effet du fipronil sur la clairance de l'antipyrine. Le fipronil pourrait induire des enzymes hépatiques qui ne seraient pas impliquées dans l'élimination de l'antipyrine chez le mouton. La différence d'effet du traitement au fipronil sur les enzymes hépatiques du rat et du mouton pourrait également être due à une différence d'exposition au fipronil et au fipronil sulfone. En effet, les concentrations plasmatiques de fipronil sulfone chez les rats traités au fipronil pendant 14

jours à 3 mg/kg/j, PO, étaient au moins deux fois supérieures à la concentration maximale observée chez le mouton (2 µg/mL chez les rats contre 1 µg/mL chez les béliers). Or, il n'est pas exclu que le fipronil sulfone joue un rôle dans la perturbation thyroïdienne observée chez le rat sous traitement au fipronil. Il est donc possible qu'une exposition à des concentrations plasmatiques de fipronil sulfone plus importante soit nécessaire pour induire certains systèmes enzymatiques chez le mouton. Enfin, cette différence interspécifique pourrait s'expliquer par une différence de sensibilité des systèmes enzymatiques hépatiques aux effets inducteurs du fipronil.

En conclusion, le fipronil, un perturbateur thyroïdien potentiel chez le rat, ne semble pas avoir cette propriété chez le mouton, espèce exprimant la TBG. Cette différence interspécifique de sensibilité aux effets toxiques du fipronil sur la fonction thyroïdienne ne serait pas due à un hypothétique rôle protecteur de la TBG face au catabolisme des HT mais plutôt à une différence interspécifique dans la capacité du fipronil à induire les systèmes enzymatiques hépatiques responsables du catabolisme hépatique des HT. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour déterminer quels mécanismes sous-jacents pourraient expliquer cette différence entre ces deux espèces.

*EXPLORATION PAR UNE APPROCHE
TRANSCRIPTOMIQUE DES
NIVEAUX D'INTERACTION POSSIBLES
DU FIPRONIL
SUR LA FONCTION THYROIDIENNE DU RAT*

1. INTRODUCTION

Nous avons vu précédemment que, chez le rat, le fipronil provoque une diminution des concentrations plasmatiques des HT par augmentation du catabolisme de la T4 en partie par l'intermédiaire d'une augmentation de l'activité de certaines enzymes hépatiques. Il semblerait donc que les effets perturbateurs thyroïdiens du fipronil proviennent tout du moins en partie d'effets exercés au niveau hépatique.

Cependant, ces résultats n'excluent pas la possibilité d'autres sites d'action du fipronil parallèlement à la mise en place de mécanismes compensateurs. En effet, l'effet du fipronil sur la clairance de la T4 est beaucoup plus marqué que son effet sur les concentrations plasmatiques de T4 ce qui suggère la mise en place de processus de compensation. Cela se traduirait par une augmentation de synthèse des HT comme le suggèrent l'augmentation de la capture d'iode et celle de l'activité de la TPO induite par le fipronil [71, 150].

Outre la mise en place de mécanismes compensateurs, le fipronil pourrait agir à d'autres niveaux de l'axe hypothalamo-hypophysio-thyroïdien chez le rat. En effet, certaines substances chimiques peuvent avoir plusieurs sites d'interaction avec la fonction thyroïdienne. C'est le cas du PTU qui non seulement inhibe l'activité de la TPO au niveau de la thyroïde mais aussi celle de la désiodase de type I qui est principalement exprimée au niveau de foie [99].

Enfin, certains effets inhérents au principe d'action insecticide du fipronil pourraient être mis en jeu. L'action insecticide du fipronil repose sur une inhibition non compétitive spécifique des récepteurs GABAergiques des insectes. Le fipronil est cependant moins puissant que le fipronil sulfone, son principal métabolite : l'IC₅₀ moyenne de déplacement de la liaison du 4'-ethynyl-4-*n*-[2,3-³H₂]-propylbicycloorthobenzoate au récepteur GABA de différents vertébrés est de 1103 nM pour le fipronil (soit 482 ng/mL) contre 175 nM pour le fipronil sulfone (soit 79 ng/mL) [145]. Une étude récente menée sur le récepteur GABA_A α1β2γ2L, plus répandu dans le cerveau des rats [184], a montré que le fipronil à 10 μM (soit environ 4.5 μg/mL) inhibait la fonction de ce récepteur. Le fipronil sulfone, à la même concentration, a le même type d'effet mais moins prononcé que le fipronil.

Des niveaux de 10 à 30 ppm de fipronil et de fipronil sulfone ont été détectés dans les cerveaux de souris seulement quelques minutes après une administration IP de 10 à 40 mg/kg de fipronil [145]. Dans nos expériences, une exposition répétée au fipronil par voie orale (3 mg/kg/j pendant 14 jours) chez le rat a conduit à des concentrations plasmatiques de fipronil sulfone de l'ordre de 2 μg/mL, soit des concentrations du même ordre de

grandeur que les concentrations utilisées dans les études sur les récepteurs GABA. Or, il existe une innervation GABAergique des neurones synthétisant la TRH chez le rat [185], ce qui soulève la question d'une possible stimulation de la sécrétion de TRH par levée de l'inhibition exercée par le récepteur GABA.

La thyroïde est l'organe de production des HT et il a été montré une accumulation non négligeable de fipronil radiomarqué dans la thyroïde ce qui peut suggérer une action directe du fipronil ou de son métabolite. L'hypophyse est un organe central de régulation de la fonction thyroïdienne puisqu'il intègre à la fois les signaux du rétrocontrôle négatif exercé par les HT et ceux de la stimulation par la TRH. De plus, c'est l'organe de production et de sécrétion de la TSH dont les concentrations plasmatiques ont été modifiées par notre traitement au fipronil. Afin d'explorer toute autre voie possible d'action du fipronil ou de son métabolite sur la fonction thyroïdienne, une approche globale sans hypothèse *a priori* a été adoptée en procédant à une analyse transcriptomique sur ces deux organes clé de la fonction thyroïdienne.

2. MATERIEL ET METHODES

Les organes utilisés proviennent des rates de l'expérience 4 (effet du fipronil sur l'activité des UDPGT vis-à-vis du 4-nitrophénol) de la partie expérimentale effectuée chez le rat. Vingt rates réparties aléatoirement en deux groupes de 10 rates ont été gavées avec la solution témoin ou le fipronil (3 mg/kg/j, PO) pendant 14 jours. Le jour suivant la dernière administration de fipronil, les rates ont été sacrifiées sous CO₂ suivi d'une saignée. La thyroïde et l'hypophyse ont été prélevées en même temps que les morceaux de foie et stockées à -80 °C après congélation rapide dans de l'azote liquide.

L'extraction d'ARN a été réalisée avec le kit RNeasy Mini kit Plus (Qiagen, Courtaboeuf, France). Les organes ont été broyés avec du tampon RLT dans des tubes de lyse (Lysing Matrix D, MP Biomedicals, Illkirch, France) pendant respectivement 50 s et 10 s à puissance 6.5 pour les thyroïdes et les hypophyses, à l'aide d'un Fastprep[®] FP120 (MP Biomedicals, Illkirch, France). Les concentrations d'ARN ont été mesurées avec un Nanodrop 1000 (Labtech, Palaiseau, France). L'intégrité des échantillons d'ARN a été analysée avec des puces RNA 6000 Nano LabChip sur un bioanalyzer 2100 (Agilent, Massy, France). Des ARNc marqués à la cyanine 3 ou 5 ont été synthétisés avec la T7 RNA polymérase à partir de 300 ng d'ARN à l'aide du Low RNA Input Linear Amplification Kit PLUS, Two-Color Kit (PN 5188-5340, Agilent, Massy, France) avec la moitié des quantités de réactifs préconisées par le fournisseur. Ils ont été purifiés avec le kit RNeasy Mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). La qualité des ARNc marqués de chaque échantillon a été vérifiée par mesure de l'activité spécifique ($\frac{\text{Fluorescence en Cy3 ou Cy5}}{\text{Concentration de l'échantillon}}$) au Nanodrop 1000 (Labtech, Palaiseau, France).

Les échantillons ont été hybridés en dye switch sur des puces ADN 4×44K (PN G4131F) comportant le génome de rat complet (Agilent, Massy, France), selon les instructions du fournisseur et les lames ont été scannées sur un scanner GenePix 4000B (MDS Analytical Technologies, Saint Grégoire, France). Les analyses ont été faites avec le logiciel R (version 2.4.1, R Development Core Team, Vienne, Autriche) et le package limma [186]. L'interprétation des données a été réalisée avec l'aide du logiciel Ingenuity Pathways Analysis (version 6.5, Ingenuity systems, Redwood City, Californie).

L'effet du traitement au fipronil sur les concentrations plasmatiques des HT et de TSH a été analysé à l'aide d'un test *t* de Student. Un test unilatéral a été utilisé car l'évolution des concentrations plasmatiques des HT et de TSH était prévisible : il était attendu que les concentrations plasmatiques des HT diminuent et que celles de TSH augmentent.

3. RESULTATS

3.1 Effet du fipronil sur les concentrations plasmatiques des HT et de TSH

La figure 13 montre les concentrations moyennes (\pm ET) de TT4, FT4, TT3, FT3 et TSH des groupes témoin et traité au fipronil après traitement. Le traitement au fipronil a été associé à une diminution significative des concentrations plasmatiques de TT4 et FT3 (effet du traitement respectivement $p=0.042$ et $p=0.021$ pour TT4 et FT3). Les concentrations plasmatiques de FT4 et TT3 du groupe traité au fipronil n'étaient pas significativement différentes du groupe témoin (respectivement $p=0.10$ et $p=0.09$). Le traitement au fipronil a également été associé à une augmentation significative des concentrations plasmatiques de TSH ($p=0.035$). Les concentrations plasmatiques de fipronil ont été non détectables (inférieures à 100 ng/mL) alors que celles de fipronil sulfone ont été de 3351 ± 799 ng/mL.

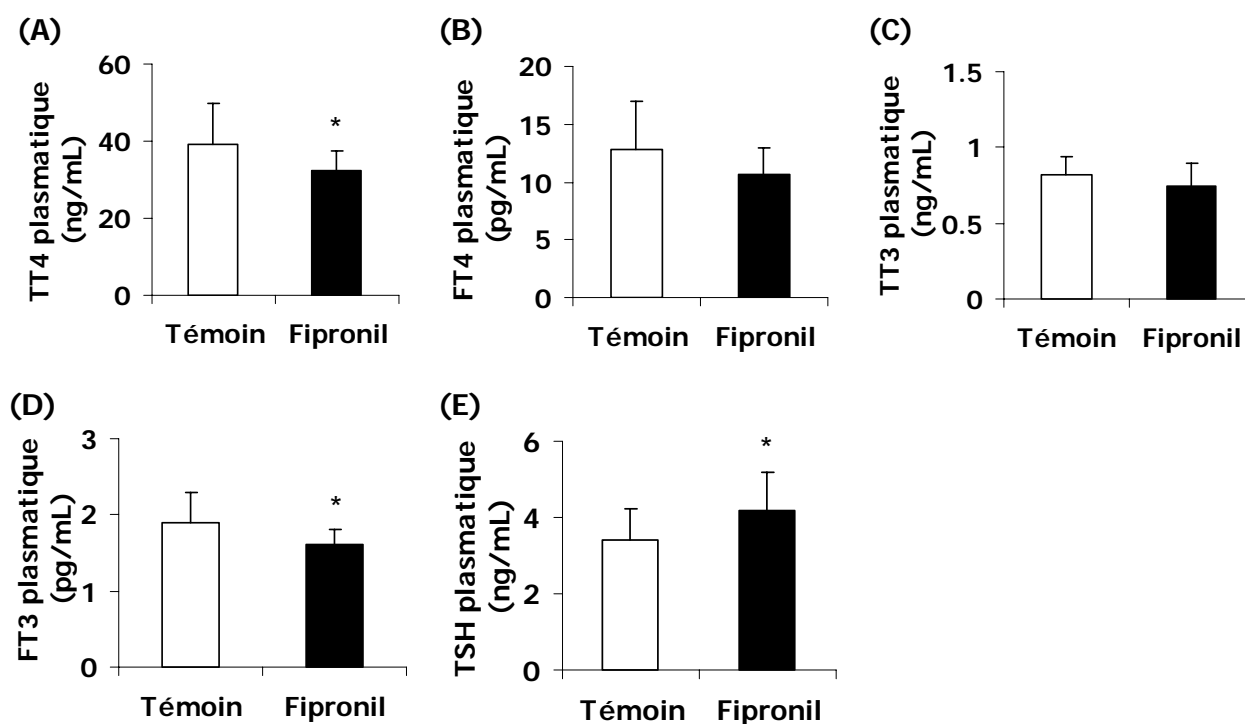


Figure 13 : Effet d'un traitement au fipronil de 14 jours sur les concentrations plasmatiques moyennes des HT et de TSH

Deux groupes de 10 rates ont été traités avec de la solution témoin (□) ou du fipronil (■ ; 3 mg/kg/j, PO) pendant 14 jours. Les concentrations plasmatiques moyennes (\pm ET) de TT4 (A), FT4 (B), TT3 (C), FT3 (D) et TSH (E) de chaque groupe ont été mesurées dans des échantillons collectés 25 h après la dernière administration de fipronil. Significativement différent du groupe témoin : * $p < 0.05$.

3.2 Traitement des données

L'utilisation de différents filtres a permis de sélectionner les spots dont la qualité permettait de poursuivre l'analyse. Parmi les critères de sélection, un spot était pris en considération si :

- $\frac{\text{signal moyen}}{\text{bruit de fond moyen}} \geq 1.5$
- $\frac{\text{signal moyen}}{\text{bruit de fond moyen}} \geq 2 \times \text{Ecart type du bruit de fond}$
- les spots dont moins de 50 % des pixels étaient saturés

Le spot était retenu si l'ensemble des critères était rempli sur au moins huit puces.

Concernant les échantillons de thyroïde, cette phase de traitement des données a permis de sélectionner 16393 spots correspondant à 15323 sondes différentes ciblant environ 13819 transcrits. De la même façon, 17261 spots correspondant à 16102 sondes différentes ciblant environ 14394 transcrits ont été sélectionnés sur les échantillons d'hypophyse.

Le traitement au fipronil a eu un effet sur l'expression des gènes dans la thyroïde, la densité des faibles valeurs de p étant plus importante, comme présenté en figure 14 A ; si le traitement n'avait pas eu d'effet, la densité serait de 1 quelques soient les valeurs de p. En revanche, la densité des gènes différentiellement exprimés dans l'hypophyse augmente conjointement aux valeurs de p (figure 14 B), résultat inattendu qui sera commenté dans la discussion.

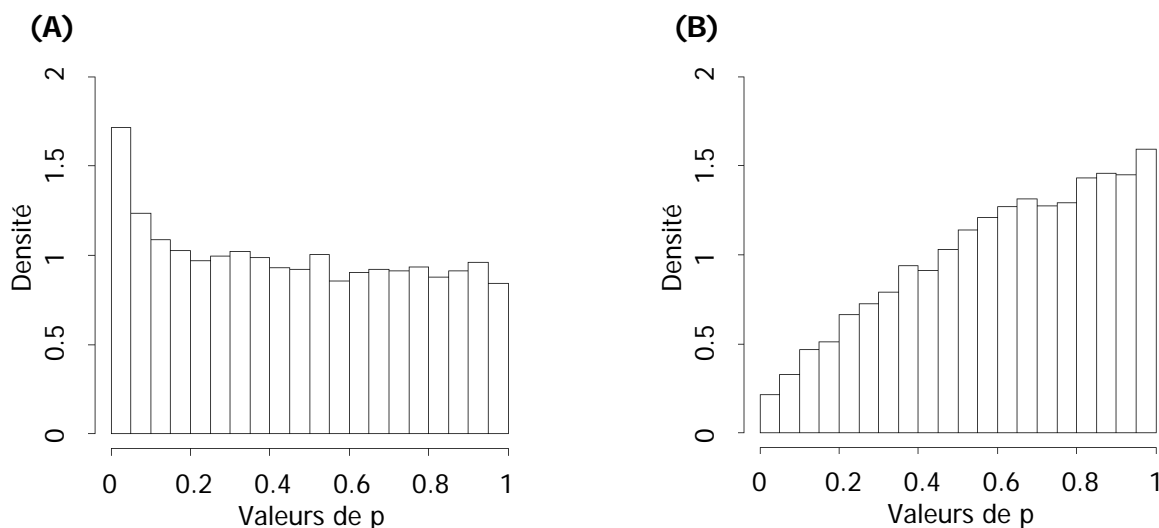


Figure 14 : Histogrammes normalisés des densités des valeurs de p

Le signal moyen de chaque spot préalablement sélectionné a été comparé entre le groupe contrôle et le groupe traité au fipronil à l'aide d'un test de Student. Ce test a permis d'attribuer une valeur de p à chaque spot. Ces histogrammes représentent la densité des valeurs de p pour un intervalle de valeurs de p donné c'est-à-dire la proportion de spots dans un intervalle de valeurs de p donné. Histogramme des valeurs de p de la thyroïde (A), histogramme des valeurs de p de l'hypophyse (B). Dans notre cas, nous avons défini qu'un spot dont la valeur de p était ≤ 0.05 signifiait que le gène correspondant était différentiellement exprimé.

Pour la suite de l'analyse à l'aide du logiciel Ingenuity Pathways Analysis, seuls les gènes correspondant aux spots dont la valeur de p était ≤ 0.05 ont été considérés comme étant différentiellement exprimés. Ainsi, 587 gènes dont 350 surexprimés et 237 sous exprimés ont été sélectionnés pour la thyroïde.

3.3 Gènes différentiellement exprimés dans la thyroïde et fonctions biologiques associées

Les gènes les plus surexprimés et les plus sous exprimés ont été classés en fonction du logarithme du rapport d'intensité moyenne (groupe traité/groupe contrôle). Des informations sur les fonctions probables des protéines codées par ces gènes ainsi que leur fonction éventuelle dans la thyroïde ont été répertoriées dans le tableau 13. De plus, l'utilisation du logiciel Ingenuity Pathways Analysis a permis de déterminer les fonctions biologiques qui pourraient être mises en jeu à partir de la liste des 587 gènes différentiellement exprimés. Ces fonctions ainsi que les gènes associés à ces fonctions sont présentés dans le tableau 14.

Tableau 13 : Liste des 10 gènes les plus surexprimés et les 10 plus sous exprimés dans la thyroïde et leurs fonctions

Symbole	Nom du gène	Log rapport	Fonction et liens probables avec la thyroïde et la fonction thyroïdienne
Gènes surexprimés			
GCG	Glucagon	1.495	Le glucagon stimule la sécrétion de calcitonine et la production d'APMc [187]. Cette production d'AMP cyclique (AMPC) pourrait induire une prolifération cellulaire par la voie AMPc-protéine kinase A.
VNN1	Vanin 1	1.314	Chez la souris, cette protéine est exprimée dans le thymus et contrôle la migration de progéniteurs de lymphocytes T.
AREG	Amphiregulin (schwannoma-derived growth factor)	1.237	L'amphiréguline, un facteur de croissance pouvant se lier et activer le récepteur à l'« Epidemal Growth Factor » (EGF). La surexpression de ce gène est fréquemment décrite dans des cancers du colon, du sein, de la prostate, du pancréas ou des poumons [188]. De plus, le promoteur de ce gène peut être activé par la voie de signalisation impliquant l'AMPc/protéine kinase A, qui est une voie de signalisation induite par la liaison de la TSH à son récepteur [189].
NPW	Neuropeptide W	1.211	Le neuropeptide W est un ligand des récepteurs couplés à la protéine G 7 et 8 et sont exprimés constitutivement dans la thyroïde. L'injection de neuropeptide W augmente la concentrations sanguine de corticostérone, de testostérone, d'ACTH et d'oestradiol [190].
CBLL1	Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence-like 1	1.200	Rôle dans la différenciation des érythrocytes [191]
EGR4	Early growth response 4	1.110	La famille des EGR regroupe des facteurs de regulation de la transcription. Leur expression peut être induite rapidement par des facteurs de croissance tels que les cytokines.
SLC5A5	Solute carrier family 5 (sodium iodide symporter), member 5	1.106	Le NIS est responsable de la capture de l'iode dans la thyroïde. Son expression et son activité sont régulées par la TSH [192, 193]
PTGR1	Prostaglandin reductase 1	1.015	Participe à la métabolisation des prostaglandines
NQO1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	0.870	La NADPH:quinone oxidoreductase 1 qui est constitutivement exprimée dans les cellules folliculaires de la thyroïde chez l'homme et est surexprimée dans des tumeurs de la thyroïde [194]
ALDH1A1	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1	0.832	L'aldéhyde déshydrogénase est impliquée dans la voie majeure du métabolisme oxydatif de l'alcool.
Gènes sous exprimés			
GPR120	G protein-coupled receptor 120	-1.001	Le récepteur GPR120 fait partie de la famille rhodopsine des récepteurs couplés à la protéine G
CNR1	Cannabinoid receptor 1	-0.845	L'activation de ce récepteur inhiberait la croissance des tumeurs dérivées de la lignée cellulaire thyroïdienne FRTL-5 dépendantes de l'oncogène ras [195, 196]
AGER	Advanced glycosylation end product-specific receptor	-0.801	AGER est un récepteur impliqué dans la réponse inflammatoire notamment dans la production de cytokines et de facteurs de croissance ainsi que dans la prolifération cellulaire [197].
MBOAT2	Membrane bound O-acyltransferase domain containing 2	-0.726	Fait partie d'une famille d'enzymes à activité acétyltransférase.
FABP3	Fatty acid binding protein 3, muscle and heart (mammary-derived growth inhibitor)	-0.710	Fait partie de la famille des « Fatty Acid Binding Protein » qui inhibent la croissance des cellules épithéliales mammaires chez la souris [198]

Tableau 13 (suite)

Symbole	Nom du gène	Log rapport	Fonction et liens probables avec la thyroïde et la fonction thyroïdienne
ACAA1	Acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1	-0.694	Fait partie des enzymes du système d'oxydation des peroxisomes
FMOD	Fibromodulin	-0.669	Participe à l'assemblage de la matrice extracellulaire
C3	Complement component 3	-0.646	Le facteur du complément C3 joue un rôle central dans l'activation du système du complément (réponse immunitaire)
C7ORF16	Chromosome 7 open reading frame 16	-0.640	Séquence de départ d'une possible région codante
SLC2A4	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4	-0.633	Transporteur du glucose régulé par l'insuline

A partir des 587 gènes significativement différentiellement exprimés ($p \leq 0.05$), les 10 gènes les plus surexprimés et les 10 plus sous exprimés ont été classés en fonction du rapport logarithmique de leurs intensités moyennes (groupe traité/ groupe contrôle) et des informations sur la fonction probable des protéines codées par ces gènes ainsi que leur lien avec la fonction thyroïdienne ont été répertoriées.

Tableau 14 : Fonctions biologiques identifiées à partir des gènes différentiellement exprimés dans la thyroïde sous traitement au fipronil

Fonction biologique ou maladie	Gènes impliqués
Cancer	ADRA1B , ADRA1D, AGER , AGPAT2, ALDH1A1 , ALDH1A3, ANPEP, AOX1, APOE, AREG , C13ORF15, C4A, CD40, CD47, COL15A1, CP, CTLA4, CXXC5, DAB2, DDX5, DDX17, ENPEP, ETV1, ETV5, FABP3 , FCGR2A, GLG1, HDAC6, HDAC10, IGF1, JAM3, LRIG1, LYZ, MGP, PPAP2A, PRKDC, RECK, RXRG, SERPING1, SLC39A4, STAT1, TIMP1, TNFRSF9, TXN
Lipid Metabolism	ACACA, ALDH1A1 , ALDH1A3, AOX1, APOE, B4GALT1, CD40, DECR2, DLAT, EDN1, EPHX1, GNRH1, HMGCR, IGF1, IRS2, MECR, NOS3, OSTALPHA, PTGS1 , SMPD3
Organismal Injury and Abnormalities	ADRA1B , ADRA1D, ADRA2C, ADRB1, APOE, B4GALT1, BAX, C2, CHRM3, CFB, CTLA4, CX3CL1, EDNRA, EGR1, F5, F8, GRIA3, LGALS3, LPL, NOS3, PON3, PTGS1 , SERPIN2, SERPING1, SOCS1, SPP1, STAT1, STAT3, TNFRSF1A, TNFRSF1B, VNN1 , VWF
Small Molecule Biochemistry	ABCC4, ABCC5, ACACA, ADRA1B , ADRA1D, ADRA2C, ALDH1A1 , ALDH1A3, ALDH2, ANPEP, AOX1, APOE, AQP7, B4GALT1, C3 , CD40, DECR2, DLAT, EDN1, ENPEP, EPHX1, FCGR2A, GCG , GNRH1, HMGCR, IGF1, INS1, IRS2, KLRC2, LEPR, MECR, NPY1R, OSTALPHA, NOS3, PTGS1 , SLC36A2, SLC4A1, SMPD3, SQLE, STXBP1, TNFRSF1A, TNFRSF1B
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	ADORA2A, ADRA1B , ADRA1D, ADRA2C, AGER , AGT, APOE, AREG , B4GALT1, BMP2, C3 , CD40, CD47, CD59, CTLA4, CX3CL1, EDN1, ENPEP, FCGR2A, FUT4, FYN, GCNT1, GDF15, GNRH1, GPR56, HSPG2, ICAM1, IL2RB, JAM3, KLRA17, LAMA5, LGALS3, NEDD9, NOS3, NRP1, PANX2, PCSK6, PGF, PRTN3, RHD, RHOA , SERPING1, SLC4A1, SOCS1, SPP1, STAT1, TNFRSF1A, TNFRSF9, TNF, TXN, VWF, WNT4, WNT5A, WNT5B
Hematological System Development and Function	ADD2, ADORA2A, AGER , AGT, APOE, B4GALT1, C3 , CD40, CD59, CTLA4, CX3CL1, EDN1, F5, F8, FCGR2A, FUT4, FYN, GCNT1, GGCX, HSPG2, ICAM1, IL2RB, KLRA17, LAMA5, NOS3, NOO1 , PTK2B, RHD, SERPING1, SLC4A1, THRA, TNFRSF9, TNFRSF1A, TNF, TXN, VWF
Tissue Development	ADRA2C, BMP5, C3 , CD40, CD59, CX3CL1, ENPP2, ICAM1, LAMA5, NRP1, RHD, SERPING1, SFRS5, SLC4A1, TNFRSF9, TNFRSF1A, TNF, VWF
Inflammatory Disease	ACE, ADORA2A, ADORA2B, ADRA1B , ADRA1D, ADRA2C, ADRB1, ANPEP, APOE, C3 , CD40, CD59, CD68, CFB, CHRM3, CTLA4, FABP3 , FCGR2A, GLG1, GNRH1, HMMR, HSPG2, IL2RB, LEPR, LYZ, OSTALPHA, PDE3B, PTGS1 , RXRG, SOCS1, SPP1, ST6GAL1, STAT1, TIMP1, TNFRSF9, TNFRSF1A, TNFRSF1B, XPA
Molecular Transport	ABCC4, ABCC5, ADRA1B , ADRA1D, ADRA2C, APOE, AQP7, B4GALT1, C3 , EDN1, EPHX1, FCGR2A, FYN, GCG , GNRH1, IGF1, INS1, IRS2, KLRC2, LEPR, NOS3, NPY1R, OSTALPHA, SGK1, SLC12A4, SLC36A2, SLC4A1, STXBP1, TNFRSF1A, TNFRSF1B
Tissue Morphology	ADD2, AGT, APOE, CD59, CX3CL1, EDN1, EGR1, FYN, IGF1, LPL, NOO1 , NRG2, PGF, PON3, SLC12A4, SERPINE2, THRA, TNFRSF9, TXN
Immune Response	AGER , AGT, APOE, B4GALT1, C2, C3 , C4A, CD40, CD59, CTLA4, CX3CL1, FCGR2A, FMOD , FUT4, FYN, GCNT1, ICAM1, IL2RB, KLRA17, NOS3, NRP1, PTK2B, THRA, TNFRSF1A, TNFRSF9, TXN
Drug Metabolism	ABCC4, ABCC5, ALDH1A1 , ALDH1A3, ADRA1B, ADRA1D, ADRA2C, AOX1, EDN1, FMO3, GCG , GNRH1, IGF1, IRS2, INS1, NOS3, NPY1R, SULT1A1
Cell Death	AGER , APOE, BMP2, CD40, CD47, GFRA1, IGF1, MED1, TNFRSF1A, TNFRSF1B, TNFRSF9, TXN
Cell Signaling	ABCC4, ABCC5, ADORA2A, ADRA1B , ADRA1D, GCG
Cellular Development	AGER , BMP2, CD40, CTLA4, FYN
Cellular Function and Maintenance	APOE, AREG , CD40, CD47, CD93, CTLA4, FCGR2A, IGF1
Cellular Growth and Proliferation	AREG , BMP2, C3 , CD40, CTLA4, FYN, IGF1, IL2RB, INS1, LGALS3, PTK2B, SPP1, STAT1, THRA

Les gènes surexprimés sont notés en rouge, les gènes sous exprimés sont notés en vert. Les gènes en caractères gras sont ceux qui sont commentés dans ce document.

4. DISCUSSION

Dans cette partie expérimentale, le traitement au fipronil a significativement diminué les concentrations plasmatiques de TT4 et de FT3 et a significativement augmenté les concentrations plasmatiques de TSH. Bien que les effets observés soient cohérents avec ceux des rates à thyroïde intacte de l'expérience 1 du chapitre II (figure 4), ceux-ci étaient moins marqués voire non significatifs pour la FT4 et la TT3. La seule différence entre les deux expériences vient du mode d'euthanasie qui a consisté en une décapitation lors de l'expérience précédente et en une asphyxie au CO₂ pour cette dernière. Cependant, à notre connaissance, aucune donnée bibliographique ne décrit d'effet indésirable de ce dernier mode d'euthanasie sur les concentrations plasmatiques des HT. Les concentrations de fipronil sulfone dans cette expérience étaient supérieures à celles de l'expérience 1 du chapitre II bien que le traitement au fipronil soit le même pour ces deux expériences (tableau 4).

L'analyse à l'aide du logiciel Ingenuity Pathways Analysis a permis d'identifier une série de fonctions biologiques potentiellement touchées par le traitement au fipronil dans la thyroïde. Malheureusement, la plupart de ces fonctions biologiques ont peu de pertinence par rapport à la thyroïde car les données actuellement disponibles sur la plupart des gènes concernent principalement leur action dans le cœur, le foie ou les reins. Cependant, cette analyse a permis de mettre en évidence certains gènes dont la régulation pourrait avoir un lien avec les concentrations accrues de TSH observées dans le groupe traité au fipronil :

- le gène ADRA1B, surexprimé dans le groupe traité au fipronil, code pour le récepteur adrénergique alpha 1B qui joue un rôle dans la régulation de l'organification de l'iode induite par la noradrénaline. Le gène contient un élément de réponse à l'AMPc [199] et son expression est stimulée par la TSH *via* la production d'AMPc [200]. Ainsi, la TSH stimulerait l'organification de l'iode induite par la noradrénaline en augmentant l'expression de ce récepteur [201].

- le gène PTGS1, également surexprimé dans le groupe traité au fipronil, code pour la prostaglandine synthase 1 qui est constitutivement exprimée dans la thyroïde chez l'homme [202]. Chez le rat, l'activité et l'expression des prostaglandines synthases seraient régulées en partie par la TSH [203].

- le gène RhoA, surexprimé dans le groupe traité au fipronil, code pour une GTPase du même nom qui est impliquée dans la prolifération des cellules de la thyroïde suite à une stimulation par la TSH [204].

Le gène différentiellement exprimé le plus pertinent par rapport à notre étude est le SLC5A5 qui code pour le NIS, responsable de la capture de l'iode dans la thyroïde. Cette observation est cohérente avec l'augmentation de la capture de l'iode par le fipronil précédemment décrite [71, 150]. De plus, la TSH augmente l'activité et la transcription de NIS [192, 193] ce qui laisse supposer que l'augmentation d'activité du NIS, observée lors d'une exposition au fipronil, résulterait d'une augmentation de son expression suite à une stimulation par la TSH.

En revanche, certains gènes n'ont pas été détectés comme différentiellement exprimés alors que leur expression est régulée par la TSH. C'est en particulier le cas des gènes de la thyroglobuline et de la TPO dont l'expression est stimulée par la TSH [205] alors que leur sonde est bien présente sur les puces.

L'ensemble de ces résultats, que ce soient les gènes d'intérêt différentiellement exprimés ou ceux qui théoriquement auraient dû être détectés, requièrent une confirmation par analyse en « Polymerase Chain Reaction » (PCR) quantitative.

En ce qui concerne l'hypophyse, la densité des gènes différentiellement exprimés augmente conjointement aux valeurs de p ce qui dénote un problème dans l'analyse. En effet, si les conditions du test de Student sont remplies (indépendance des tests, homogénéité des variances et normalité des données) deux situations sont possibles : le traitement n'a pas d'effet sur l'expression des gènes auquel cas la densité des valeurs de p est égale à un, soit un certain nombre de gènes sont différentiellement exprimés sous le traitement auquel cas une surabondance de faibles valeurs de p est observée, comme c'est le cas de la thyroïde (figure 14 A). Le fait d'obtenir un autre type de figure signifierait qu'au moins une des hypothèses du test de Student ne soit pas remplie.

Quelques hypothèses peuvent être émises pour expliquer et tenter de corriger ce problème d'analyse des données: il se peut que les données utilisées pour l'analyse ne soient pas correctes du fait d'une sélection inadéquate des spots.

Une des hypothèses du test statistique est l'homogénéité des variances ; il se peut que les puces ne soient pas homogènes entre elles. L'affectation de poids aux puces a permis de détecter une puce différente des autres. Cependant, même en éliminant les données correspondant à cette puce, le problème n'a pas été résolu. Un autre moyen de corriger la variabilité des données serait de tester une autre normalisation des données, à moins que la variabilité des données ne vienne du manque d'homogénéité au niveau des prélèvements d'hypophyse.

En dernier recours, il est possible qu'un autre test statistique soit nécessaire pour analyser ces données.

Cependant, il est à noter que l'analyse de ces données a mis en évidence la surexpression du gène de la sous-unité beta de la TSH. Bien que des modifications des conditions d'analyse, comme explicité précédemment, seront apportées afin d'améliorer la validité de l'analyse, il est peu probable que ce résultat soit modifié car le gène de la sous-unité beta de la TSH fait partie des gènes des plus fortement surexprimés. Cette observation est cohérente avec l'augmentation des concentrations plasmatiques de TSH observée dans le groupe traité au fipronil. Une confirmation de la surexpression de ce gène dans le groupe traité au fipronil par PCR quantitative pourrait d'ores et déjà être envisagée.

En conclusion, ces résultats préliminaires suggèrent que la perturbation thyroïdienne sous traitement au fipronil entraîne des modifications d'expression de gènes régulés par la TSH dans la thyroïde et que l'augmentation de capture d'iode dans la thyroïde passe par une augmentation de l'expression du NIS. Le traitement au fipronil, sous couvert de confirmation par PCR quantitative, induirait également une augmentation de l'expression du gène de la sous-unité beta de la TSH.

Cependant, cette analyse ne permet pas de déterminer quelle voie de régulation prédomine dans la stimulation potentielle de la synthèse de TSH. En effet, cette stimulation pourrait provenir d'une diminution du rétrocontrôle négatif exercé par les HT suite à la diminution de leurs concentrations plasmatiques, soit d'une sécrétion accrue de TRH. Cette sécrétion accrue de TRH pourrait elle aussi avoir pour origine une levée du rétrocontrôle négatif exercée par les HT ou provenir d'une levée d'inhibition de la sécrétion de TRH exercée par les récepteurs GABA suite à leur inhibition par le fipronil ou le fipronil sulfone. Des investigations supplémentaires sont nécessaires pour répondre à cette question dont la réponse pourrait potentiellement remettre en cause l'innocuité du fipronil ou de son métabolite sur le fonctionnement neurologique des mammifères.

DISCUSSION GENERALE
ET
PERSPECTIVES

Dans la première partie expérimentale, nous avons confirmé le schéma physiopathologique proposé pour expliquer l'action du fipronil sur la fonction thyroïdienne chez le rat à savoir une diminution des concentrations plasmatiques de T4 et une augmentation des concentrations plasmatiques de TSH associées à une augmentation de la clairance de la T4. Nous avons de plus démontré qu'un traitement au fipronil (3 mg/kg/j de fipronil, PO, pendant 14 jours) pouvait diminuer des concentrations plasmatiques de T3 ainsi que celles des formes libres des HT. Nous avons également développé un modèle de rats THX+T3 nous permettant de montrer que ce traitement au fipronil était associé à une augmentation de clairance de TT4 mais aussi de FT4. De plus, nous avons documenté les effets du fipronil sur les fonctions hépatiques en montrant que la clairance de l'antipyrine, témoin de l'activité de certains CYP *in vivo*, et l'activité des UDPGT métabolisant le 4-nitrophénol chez des rates à thyroïde intacte sont également augmentées suite à ce même traitement. Enfin, pour chacune des expériences, nous avons, pour la première fois, caractérisé l'exposition des rats au fipronil et à son principal métabolite, le fipronil sulfone. Notre schéma posologique a conduit à des concentrations plasmatiques de fipronil inférieures à 5 ng/mL et des concentrations de fipronil sulfone, son principal métabolite, de 1 à 2 µg/mL, soit un rapport fipronil sulfone/fipronil d'au moins 200.

Dans un deuxième temps, nous avons évalué la toxicité du fipronil sur la fonction thyroïdienne dans une espèce dont la fonction thyroïdienne est plus proche de celle de l'homme que le rat : le mouton. Dans cette espèce, aucune perturbation des concentrations plasmatiques des HT n'a été mise en évidence chez des béliers à thyroïde intacte traités au fipronil à 5 mg/kg tous les quatre jours, PO, pendant un mois. Les paramètres PK de T4 préalablement étudiés dans un modèle de brebis THX n'ont pas été modifiés par un traitement au fipronil à 0.5 mg/kg/j, IV, pendant 14 jours alors qu'un traitement au phénobarbital (40 mg/kg/j, IP, pendant quatre jours) a augmenté les clairances de TT4 et de FT4. Le même traitement au fipronil que les béliers en termes de dose, de voie d'administration et de durée de traitement a modifié uniquement la clairance de la FT4, et ce de façon modérée, dans un modèle de brebis THX+T3. De même, le traitement au fipronil (0.5 mg/kg/j, IV, pendant 14 jours) n'a pas eu d'effet sur les paramètres PK de l'antipyrine chez des brebis à thyroïde intacte alors que la clairance de l'antipyrine après le traitement au phénobarbital a plus que doublé. Les différents traitements au fipronil (0.5 mg/kg/j, IV ou 5 mg/kg tous les quatre jours, PO) ont conduit à des concentrations plasmatiques de fipronil à l'état d'équilibre de l'ordre de 100 à 400 ng/mL et un rapport fipronil sulfone/fipronil d'environ 3 excepté pour les brebis THX où le rapport était de 0.8 avec des concentrations plasmatiques de fipronil d'environ 400 ng/mL.

Enfin, nous avons comparé le transcriptome de rates traitées au fipronil par rapport à des rates témoins au niveau de la thyroïde et de l'hypophyse. Une surexpression du gène de la sous-unité beta de la TSH au niveau de l'hypophyse a été observée parallèlement à des concentrations plasmatiques de TSH supérieures chez les rates traitées au fipronil ce qui suggère que non seulement la libération mais également la synthèse de TSH ont été augmentées. De la même manière, la surexpression du gène du NIS dans la thyroïde a été détectée et l'augmentation de la capture d'iode dans la thyroïde chez le rat traité au fipronil a déjà été démontrée, ce qui tend à montrer que cette augmentation d'activité aurait pour origine une augmentation de l'expression du symporteur. Or, son activité et son expression sont stimulées par la TSH [206] ce qui est cohérent avec les concentrations plasmatiques accrues de TSH dans le groupe de rats traité au fipronil. Cette analyse a permis d'identifier d'autres gènes surexprimés dans la thyroïde lors du traitement au fipronil, dont l'expression est régulée par la TSH. Cette expérience a donc permis de confirmer en partie le schéma physiopathologique du mode d'action du fipronil sur la fonction thyroïdienne du rat au niveau transcriptionnel.

L'ensemble de ces résultats requiert certains points de confirmation ou d'approfondissement et soulèvent également un certain nombre de questions qui restent à élucider.

Quelles sont les voies d'élimination de la T4 induites par le traitement au fipronil chez le rat ?

Chez le rat, les mécanismes précis d'augmentation de clairance de la T4 restent à identifier. Tout d'abord, l'activité microsomale UDPGT vis-à-vis de la T4 serait à caractériser pour confirmer l'augmentation d'activité UDPGT observée avec le 4-nitrophénol. En effet, l'activité microsomale vis-à-vis du 4-nitrophénol ne reflète pas toujours celle vis-à-vis de la T4 ; la corrélation entre ces deux activités peut dépendre du xénobiotique auquel le rat est exposé [169]. Même si l'augmentation de l'activité vis-à-vis de la T4 est confirmée, l'induction des UDPGT n'est pas toujours liée à l'augmentation de clairance de la T4 [106] ce qui peut laisser supposer la mise en jeu d'autres voies métaboliques d'élimination de la T4 comme l'élimination par les désiodases. En effet, 20 à 25 % de la T4 est désiodée en T3 [98]. Comme elle est une source de T3 et que nous avons observé une diminution concomitante des concentrations plasmatiques de T3, cette hypothèse reste à vérifier.

Un autre mécanisme d'élimination de la T4 a récemment été décrit chez le rat : l'élimination biliaire de T4 non conjuguée médiée en partie par une augmentation de l'activité des transporteurs spécifiques des HT tel que OATP1 et OATP2 [175]. La proportion de T4 non conjuguée éliminée par voie biliaire sous traitement au fipronil serait à déterminer afin de déceler un éventuel rôle des transporteurs spécifiques des HT dans l'augmentation de clairance de la T4 que nous avons décrite.

La clairance de la T3 est-elle augmentée par le traitement au fipronil chez le rat et si c'est le cas, par quelles voies d'élimination ?

Nous avons observé que le traitement au fipronil chez le rat à thyroïde intacte diminue significativement les concentrations plasmatiques de TT3 et FT3 ainsi que les concentrations plasmatiques de TT3 chez les rates THX+T3. En revanche, chez les rates utilisées pour l'analyse génomique, seule une diminution significative de FT3 a été observée. Cette diminution des concentrations plasmatiques de T3 peut provenir d'une augmentation de l'élimination de T3. Une mesure de la clairance de la T3 chez des rates traitées au fipronil permettrait de confirmer que le fipronil affecte également le métabolisme de la T3. Cette mesure nécessiterait l'emploi de T3 radiomarquée chez des rates à thyroïde intacte, notre modèle THX+T3 ne pouvant être utilisé et le recours à un modèle THX+T4 produirait de la T3 endogène par désiodation de la T4. Si cette augmentation d'élimination de T3 était confirmée, d'autres voies métaboliques d'élimination que celles impliquées dans l'élimination de la T4 seraient à envisager. Une attention particulière serait à apporter sur l'effet du fipronil sur l'activité de la désiodase de type 3, décrite comme une des principales voies d'élimination de la T3 [99].

Quelles sont les enzymes hépatiques dont l'expression et/ou l'activité sont modifiées par le traitement au fipronil et par quelle voie de régulation ?

Des investigations plus poussées sur la nature des enzymes hépatiques induites par le traitement au fipronil chez le rat seraient à mener, notamment sur l'identification des CYP dont l'activité a été modifiée par le traitement au fipronil.

Par ailleurs, les CYP impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques et des hormones peuvent être régulés par les récepteurs nucléaires « constitutive androstane receptor » (CAR) et/ou « pregnane-X-receptor » (PXR) [207]. Ces récepteurs sont principalement exprimés dans les hépatocytes et activent la transcription de gènes codant

pour différentes enzymes impliquées dans le métabolisme et l'excrétion des xénobiotiques, en général suite à la liaison avec l'un d'entre eux. Le récepteur CAR joue notamment un rôle prépondérant dans la perturbation thyroïdienne provoquée par le phénobarbital chez la souris [208]. Or, Lemaire *et al.* [209] ont démontré *in vitro* que le fipronil est un ligand du PXR humain. Des recherches plus poussées sont nécessaires pour déterminer, chez le rat, l'importance de la voie de régulation CAR/PXR dans la perturbation thyroïdienne provoquée par le fipronil et notamment son implication éventuelle dans l'augmentation de l'activité des CYP que nous avons observée.

Quelle est l'origine exacte de l'augmentation de production de TSH chez le rat ?

Nous avons mis en évidence au niveau génomique, sous couvert d'une vérification ultérieure, que le traitement au fipronil augmente l'expression du gène de la sous-unité beta de la TSH et est associé à des concentrations plasmatiques de TSH accrues. Ces résultats ne permettent cependant pas de déterminer l'origine de la stimulation de la synthèse et de la sécrétion de TSH.

Les concentrations plasmatiques des HT étant plus faibles chez des rates traitées au fipronil, l'augmentation de sécrétion pourrait être due à une levée du rétrocontrôle négatif exercé par les HT sur la sécrétion de la TSH.

Elle pourrait également provenir d'une stimulation de la TRH *via* une inhibition des récepteurs GABA des neurones à TRH par le fipronil ou son métabolite. L'injection de GABA dans le troisième ventricule du cerveau de rats diminue rapidement les concentrations plasmatiques de TSH [210]. La comparaison de l'effet du GABA sur la sécrétion de TSH entre des rats traités au fipronil et des rats témoins permettrait de déterminer si le fipronil ou son métabolite a un effet sur le contrôle GABAergique de la sécrétion de TSH.

Pourquoi les effets du traitement au fipronil sur l'activité des enzymes hépatiques ont été si modérés voire absents chez le mouton ?

Chez le mouton, le fipronil n'a eu aucun effet sur les concentrations plasmatiques des HT et sur la clairance de l'antipyrine, et n'a eu qu'un effet modéré uniquement sur la clairance de la FT4. Le traitement au phénobarbital, molécule connue pour ses propriétés d'induction enzymatique hépatique, a fortement augmenté les clairances de la FT4 mais aussi de la TT4 et de l'antipyrine chez le mouton. Le fipronil, contrairement au phénobarbital, n'entraînerait donc pas d'induction enzymatique, du moins sur les systèmes responsables de

la métabolisation de l'antipyrine. De plus, chez le mouton, les cinétiques de fipronil sont relativement similaires entre la première et la dernière administration de fipronil. Cela suggère que dans nos conditions d'exposition au fipronil, il n'y aurait pas eu non plus d'induction des enzymes responsables de la métabolisation du fipronil.

Les données obtenues *in vitro* sur hépatocytes humains montrent que la concentration de fipronil pour une induction maximale des CYP 3A4 et 1A1 est de 1 μ M soit environ 400 ng/mL [148]. Ce niveau de concentration plasmatique de fipronil n'a été atteint que pour les béliers et les brebis THX. Lors de l'étude de l'effet du fipronil sur la clairance de l'antipyrine, les concentrations plasmatiques de fipronil étaient de l'ordre de 100 ng/mL. Il est possible que ces concentrations soient inférieures à celles capables d'induire les CYP responsables du métabolisme de l'antipyrine.

Une des différences flagrantes entre le rat et le mouton concerne l'exposition au fipronil et au fipronil sulfone. En effet, les concentrations plasmatiques de fipronil sulfone à l'état d'équilibre chez le rat sont 4 à 7 fois plus élevées que chez le mouton. Ce qui suggère que le fipronil sulfone pourrait être en partie responsable des effets perturbateurs thyroïdiens du fipronil chez le rat. Il serait alors possible que le mouton ne soit pas exposé à des concentrations plasmatiques de fipronil sulfone suffisantes pour observer un effet délétère du traitement au fipronil.

D'autre part, le fipronil est un ligand du récepteur PXR humain [209]. Or, il existe des différences interspécifiques au niveau du domaine de liaison des récepteurs CAR/PXR, en particulier pour le récepteur PXR. Cela implique qu'un xénobiotique, ligand des récepteurs CAR/PXR dans une espèce, ne l'est pas forcément dans une autre espèce; c'est notamment le cas entre l'homme et les rongeurs [207]. L'absence d'effet inducteur enzymatique hépatique du fipronil chez le mouton pourrait donc s'expliquer par l'absence de liaison du fipronil au récepteur CAR/PXR du mouton.

Enfin, il ne peut être exclu que le fipronil puisse induire des enzymes hépatiques qui ne seraient pas impliquées dans l'élimination de l'antipyrine chez le mouton. L'étude *in vitro* de l'effet du fipronil sur l'activité des enzymes hépatiques du mouton permettrait de confirmer ou d'infirmer les résultats observés *in vivo* et d'étendre l'analyse à d'autres enzymes hépatiques que les seules enzymes impliquées dans le métabolisme de la T4 et de l'antipyrine, qui ont fait l'objet de notre étude *in vivo*.

Quelle est la pertinence de l'exposition au fipronil et au fipronil sulfone du rat et du mouton par rapport à l'homme ?

Chez le mouton, le traitement au fipronil a conduit à un rapport des concentrations plasmatiques de fipronil sulfone/fipronil à 24 h post administration de fipronil de 0.6. Chez l'homme, ce rapport se situait entre 0.25 et 0.5, 24 h après une ingestion accidentelle de fipronil [176] alors qu'il était de 2.5 chez le rat. Ces données suggèrent que le modèle ovin serait plus pertinent que le rat vis-à-vis de l'homme non seulement en termes de régulation de la fonction thyroïdienne mais également en termes d'exposition au fipronil et à son métabolite. En revanche, le rapport des concentrations plasmatiques à l'état d'équilibre de fipronil sulfone/fipronil était autour de 3 chez les moutons à statut thyroïdien normal ou THX+T3 alors qu'il était de seulement 0.8 chez les brebis THX non traitées à la T3. Chez ces dernières, les concentrations de fipronil étaient supérieures à celles des brebis à thyroïde intacte recevant le même traitement, suggérant une métabolisation plus faible du fipronil chez les brebis THX. Le fipronil est principalement métabolisé en fipronil sulfone par le CYP3A4 chez l'homme [143]. Or, l'expression des CYP est régulée en partie par les HT, notamment la T3 [156, 157]. L'absence de T3 modifierait l'expression et l'activité des CYP métabolisant le fipronil conduisant à des concentrations de fipronil supérieures et des concentrations de fipronil sulfone plus faibles chez les animaux THX que chez les animaux à statut thyroïdien normal. Ainsi, il est fortement probable que le métabolisme du fipronil dépende du statut thyroïdien de chaque individu ce qui a déjà été décrit pour d'autres xénobiotiques chez le mouton ou dans d'autres espèces [211, 212].

La caractérisation des niveaux d'exposition au fipronil et au fipronil sulfone chez le rat après des administrations répétées de fipronil montre que le rat est exposé à des concentrations plasmatiques de fipronil sulfone jusqu'à 300 fois supérieures à celles de fipronil, ce qui soulève la question de la contribution du fipronil sulfone aux effets toxiques observés lors d'une exposition au fipronil. D'autres investigations sont nécessaires pour déterminer la toxicité propre du fipronil sulfone et son potentiel perturbateur thyroïdien chez le rat. L'étude de l'effet sur les concentrations plasmatiques des HT et de TSH d'un traitement au fipronil sulfone reproduisant les concentrations plasmatiques atteintes lors du traitement au fipronil, pourrait permettre de déterminer la contribution du fipronil sulfone aux effets perturbateurs thyroïdiens observés sous traitement au fipronil.

Que suggère l'ensemble de ces résultats en termes de risques pour l'homme ?

De toute évidence, même si le métabolisme du fipronil chez le mouton semble assez proche de celui de l'homme, les concentrations plasmatiques atteintes chez le mouton, que ce soit celles de fipronil ou de fipronil sulfone sont beaucoup plus importantes que celles auxquelles la population humaine est susceptible d'être exposée. De manière générale, les concentrations utilisées dans les études toxicologiques (*in vitro*, environ 40 ng/mL jusqu'à quelques µg/mL et *in vivo*, jusqu'à 2 µg/mL de fipronil sulfone chez le rat et jusqu'à environ 1200 ng/mL de fipronil et fipronil sulfone cumulés chez le mouton) sont bien supérieures à celles potentiellement retrouvées chez l'homme. Excepté en cas d'ingestion accidentelle d'une forte dose de fipronil (2.5 à 5 g) où les concentrations cumulées de fipronil et de fipronil sulfone atteintes peuvent être de l'ordre de 600 à 1000 ng/mL [176] et sont alors du même ordre de grandeur que celles obtenues chez les moutons (500 à 1200 ng/mL), la dose maximale théorique d'exposition au fipronil calculée suivant des scénarios maximalistes par l'AFSSA varie de 18 % de la DJA pour les adultes à plus de 900 % de la DJA pour les enfants en bas-âge, soit au maximum 1.8 µg/kg de poids corporel/j. Cette dose maximale correspond à une dose environ 1000 fois inférieure à celle administrée oralement aux moutons. De plus, des investigations auprès de personnel travaillant dans les usines de production ou dans des stations de semences ont montré des concentrations plasmatiques cumulées de fipronil et fipronil sulfone majoritairement inférieures à 50 ng/mL [147].

Cependant, malgré l'absence d'effet du fipronil sur la fonction thyroïdienne chez le mouton à de fortes concentrations plasmatiques de fipronil et de fipronil sulfone, nous ne pouvons pas exclure des effets indésirables du fipronil chez l'homme. Il est nécessaire de prendre en considération le fait que la population humaine peut être exposée à de multiples xénobiotiques et qu'une exposition à différents xénobiotiques pourrait avoir un effet additif voire synergique sur les effets toxiques d'un seul xénobiotique [213]. Or, si ces effets toxiques agissent sur un élément clé de l'organisme tel que les CYP qui sont responsables de la métabolisation de nombreuses molécules endogènes et exogènes, les conséquences de ces effets peuvent s'étendre aux différents systèmes endocriniens mais également au métabolisme des médicaments avec par exemple l'apparition possible d'effets indésirables ou un manque d'effet du médicament dus à une modification de sa métabolisation [214].

Qu'en est-il de l'hypothétique rôle de la TBG dans le maintien de l'homéostasie de la fonction thyroïdienne ?

Dans cette étude, nous n'avons pas pu déterminer si, comme il est souvent supposé, la T4 liée à la TBG pouvait compenser une élimination accrue de T4 libre. Si cette hypothèse était vérifiée et que le fipronil avait augmenté la clairance de la T4 chez le mouton, nous aurions pu nous attendre à ce que, chez le mouton, le fipronil ne modifie pas les concentrations plasmatiques de FT4 grâce à l'apport de T4 provenant de la TBG, mais diminue les concentrations plasmatiques de TT4. Cependant, le fipronil n'a eu qu'un effet modéré sur la clairance de la FT4 chez le mouton ce qui ne nous a pas permis de vérifier cette hypothèse.

Pour déterminer si la TBG avait un rôle protecteur de l'homéostasie de la fonction thyroïdienne, nous avons comparé les effets d'un perturbateur thyroïdien dans deux espèces différentes, l'une dépourvue de TBG et l'autre l'exprimant. Or, cette étude a mis en évidence un certain nombre de différences interspécifiques (différence de métabolisation du xénobiotique et possible différence de sensibilité à une induction des différents systèmes enzymatiques hépatiques) rendant impossible toute comparaison des effets observés entre les deux espèces et toute conclusion quant au rôle de la TBG. Pour s'affranchir de ces différences interspécifiques, il serait nécessaire de comparer les effets d'un perturbateur thyroïdien dans la même espèce avec des individus exprimant ou n'exprimant pas la TBG. Ainsi, il pourrait être envisagé de traiter des rats à la TBG mais une quantité très importante de TBG serait nécessaire alors que la TBG purifiée n'est disponible qu'en faible quantité.

En conclusion, cette étude a permis de mettre en évidence une différence interspécifique à prendre en compte lors de l'évaluation toxicologique d'un xénobiotique : la sensibilité d'induction des systèmes enzymatiques hépatiques d'une espèce. Ces différences de sensibilité à une induction enzymatique suite à une exposition à un xénobiotique ont été décrites, notamment pour les CYP, entre différentes souches de rats [215] ainsi qu'entre différents rongeurs [216, 217]. Ainsi, l'extrapolation à l'homme des résultats toxicologiques d'un perturbateur thyroïdien obtenus dans une autre espèce nécessite la prise en compte des différences interspécifiques sur la fonction thyroïdienne elle-même, sur le métabolisme du xénobiotique mais également sur les différences de sensibilité d'induction des différents systèmes enzymatiques hépatiques entre espèces. Cette étude permet de mettre en lumière la multitude des facteurs de confusion pouvant nuire à l'extrapolation à l'homme des effets toxiques observés dans une espèce.

BIBLIOGRAPHIE

1. Commission Européenne, *European Workshop on the Impact of Endocrine Disruptors on Human Health and Wildlife, Report proceedings EUR 17549*. 1996.
2. Colborn, T., M. Smolen, and R. Rolland, *Taking a lead from wildlife*. Neurotoxicol Teratol, 1996. 18(3): p. 235-7; discussion 271-6.
3. Remontet, L., *et al.*, *Cancer incidence and mortality in France over the period 1978-2000*. Rev Epidemiol Sante Publique, 2003. 51(1 Pt 1): p. 3-30.
4. Skakkebaek, N.E., *et al.*, *Is human fecundity declining?* Int J Androl, 2006. 29(1): p. 2-11.
5. Langer, P., *Persistent Organochlorinated Pollutants (Pcb, Dde, Hcb, Dioxins, Furans) and the Thyroid - Review 2008*. Endocr Regul, 2008. 4(2): p. 79-104.
6. Todaka, T., *et al.*, *Concentrations of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and non-ortho and mono-ortho polychlorinated biphenyls in blood of Yusho patients*. Chemosphere, 2007. 66(10): p. 1983-9.
7. UIC, (*Union des Industries Chimiques*) http://www.uic.fr/cc_donnees_globales.asp. 2008.
8. UIPP, *Union des Industries de la Protection des Plantes* <http://www.uipp.org/repere/chiffre.php>. 2008.
9. Porterfield, S.P. and L.B. Hendry, *Impact of PCBs on thyroid hormone directed brain development*. Toxicol Ind Health, 1998. 14(1-2): p. 103-20.
10. Puymirat, J., *et al.*, *Triiodothyronine enhances the morphological maturation of dopaminergic neurons from fetal mouse hypothalamus cultured in serum-free medium*. Neuroscience, 1983. 10(3): p. 801-10.
11. Oh, J.D., L.L. Butcher, and N.J. Woolf, *Thyroid hormone modulates the development of cholinergic terminal fields in the rat forebrain: relation to nerve growth factor receptor*. Brain Res Dev Brain Res, 1991. 59(2): p. 133-42.
12. Porterfield, S.P. and C.E. Hendrich, *The role of thyroid hormones in prenatal and neonatal neurological development--current perspectives*. Endocr Rev, 1993. 14(1): p. 94-106.
13. Vulsmas, T., M.H. Gons, and J.J. de Vijlder, *Maternal-fetal transfer of thyroxine in congenital hypothyroidism due to a total organification defect or thyroid agenesis*. N Engl J Med, 1989. 321(1): p. 13-6.
14. Haddow, J.E., *et al.*, *Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent neuropsychological development of the child*. N Engl J Med, 1999. 341(8): p. 549-55.
15. Pop, V.J., *et al.*, *Low maternal free thyroxine concentrations during early pregnancy are associated with impaired psychomotor development in infancy*. Clin Endocrinol (Oxf), 1999. 50(2): p. 149-55.

16. Akaike, M., *et al.*, *Hyperactivity and spatial maze learning impairment of adult rats with temporary neonatal hypothyroidism*. *Neurotoxicol Teratol*, 1991. 13(3): p. 317-22.
17. Goldey, E.S., *et al.*, *Effects of developmental hypothyroidism on auditory and motor function in the rat*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1995. 135(1): p. 67-76.
18. Levin, E.D., S.L. Schantz, and R.E. Bowman, *Delayed spatial alternation deficits resulting from perinatal PCB exposure in monkeys*. *Arch Toxicol*, 1988. 62(4): p. 267-73.
19. Rice, D.C. and S. Hayward, *Effects of postnatal exposure to a PCB mixture in monkeys on nonspatial discrimination reversal and delayed alternation performance*. *Neurotoxicology*, 1997. 18(2): p. 479-94.
20. Schantz, S.L., J. Moshtaghian, and D.K. Ness, *Spatial learning deficits in adult rats exposed to ortho-substituted PCB congeners during gestation and lactation*. *Fundam Appl Toxicol*, 1995. 26(1): p. 117-26.
21. Roegge, C.S., *et al.*, *Gestational-lactational exposure to Aroclor 1254 impairs radial-arm maze performance in male rats*. *Toxicol Sci*, 2000. 57(1): p. 121-30.
22. Widholm, J.J., *et al.*, *Spatial reversal learning in Aroclor 1254-exposed rats: sex-specific deficits in associative ability and inhibitory control*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2001. 174(2): p. 188-98.
23. Jacobson, J.L., S.W. Jacobson, and H.E. Humphrey, *Effects of exposure to PCBs and related compounds on growth and activity in children*. *Neurotoxicol Teratol*, 1990. 12(4): p. 319-26.
24. Schantz, S.L., *Developmental neurotoxicity of PCBs in humans: what do we know and where do we go from here?* *Neurotoxicol Teratol*, 1996. 18(3): p. 217-27; discussion 229-76.
25. Stewart, P., *et al.*, *Prenatal PCB exposure and neonatal behavioral assessment scale (NBAS) performance*. *Neurotoxicol Teratol*, 2000. 22(1): p. 21-9.
26. Huisman, M., *et al.*, *Neurological condition in 18-month-old children perinatally exposed to polychlorinated biphenyls and dioxins*. *Early Hum Dev*, 1995. 43(2): p. 165-76.
27. Williams, E.D., *Mechanisms and pathogenesis of thyroid cancer in animals and man*. *Mutat Res*, 1995. 333(1-2): p. 123-9.
28. Hill, R.N., *et al.*, *Risk assessment of thyroid follicular cell tumors*. *Environ Health Perspect*, 1998. 106(8): p. 447-57.
29. Mallin, K., *et al.*, *Cohort mortality study of capacitor manufacturing workers, 1944-2000*. *J Occup Environ Med*, 2004. 46(6): p. 565-76.
30. Schreinemachers, D.M., J.P. Creason, and V.F. Garry, *Cancer mortality in agricultural regions of Minnesota*. *Environ Health Perspect*, 1999. 107(3): p. 205-11.
31. Yassi, A., R. Tate, and D. Fish, *Cancer mortality at a transformer manufacturing plant: cohort construction and analysis*. *Am J Ind Med*, 1995. 27(6): p. 911-3.

32. Kimbrough, R.D., M.L. Doemland, and M.E. LeVois, *Mortality in male and female capacitor workers exposed to polychlorinated biphenyls*. J Occup Environ Med, 1999. 41(3): p. 161-71.
33. Jannini, E.A., S. Ulisse, and M. D'Armiento, *Thyroid hormone and male gonadal function*. Endocr Rev, 1995. 16(4): p. 443-59.
34. Krassas, G.E., *Thyroid disease and female reproduction*. Fertil Steril, 2000. 74(6): p. 1063-70.
35. Crofton, K.M., *Thyroid disrupting chemicals: mechanisms and mixtures*. Int J Androl, 2008. 31(2): p. 209-23.
36. Gauger, K.J., et al., *Polychlorinated biphenyls 105 and 118 form thyroid hormone receptor agonists after cytochrome P4501A1 activation in rat pituitary GH3 cells*. Environ Health Perspect, 2007. 115(11): p. 1623-30.
37. Hallgren, S., et al., *Effects of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) on thyroid hormone and vitamin A levels in rats and mice*. Arch Toxicol, 2001. 75(4): p. 200-8.
38. Goldey, E.S., et al., *Developmental exposure to polychlorinated biphenyls (Aroclor 1254) reduces circulating thyroid hormone concentrations and causes hearing deficits in rats*. Toxicol Appl Pharmacol, 1995. 135(1): p. 77-88.
39. Ness, D.K., et al., *Effects of perinatal exposure to specific PCB congeners on thyroid hormone concentrations and thyroid histology in the rat*. Toxicol Lett, 1993. 68(3): p. 311-23.
40. Morse, D.C., et al., *Alterations in rat brain thyroid hormone status following pre- and postnatal exposure to polychlorinated biphenyls (Aroclor 1254)*. Toxicol Appl Pharmacol, 1996. 136(2): p. 269-79.
41. Nishimura, N., et al., *Rat thyroid hyperplasia induced by gestational and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin*. Endocrinology, 2003. 144(5): p. 2075-83.
42. Bastomsky, C.H., *Enhanced thyroxine metabolism and high uptake goiters in rats after a single dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin*. Endocrinology, 1977. 101(1): p. 292-6.
43. Potter, C.L., et al., *Thyroid status and thermogenesis in rats treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin*. Toxicol Appl Pharmacol, 1986. 84(1): p. 45-55.
44. Zhou, T., et al., *Effects of short-term in vivo exposure to polybrominated diphenyl ethers on thyroid hormones and hepatic enzyme activities in weanling rats*. Toxicol Sci, 2001. 61(1): p. 76-82.
45. Gupta, B.N., et al., *Effects of a polybrominated biphenyl mixture in the rat and mouse. I. Six-month exposure*. Toxicol Appl Pharmacol, 1983. 68(1): p. 1-18.
46. Zhou, T., et al., *Developmental exposure to brominated diphenyl ethers results in thyroid hormone disruption*. Toxicol Sci, 2002. 66(1): p. 105-16.

47. O'Connor, J.C., S.R. Frame, and G.S. Ladics, *Evaluation of a 15-day screening assay using intact male rats for identifying antiandrogens*. Toxicol Sci, 2002. 69(1): p. 92-108.
48. Morse, D.C., et al., *Interference of polychlorinated biphenyls in hepatic and brain thyroid hormone metabolism in fetal and neonatal rats*. Toxicol Appl Pharmacol, 1993. 122(1): p. 27-33.
49. Kleiman de Pisarev, D.L., M.C. Rios de Molina, and L.C. San Martin de Viale, *Thyroid function and thyroxine metabolism in hexachlorobenzene-induced porphyria*. Biochem Pharmacol, 1990. 39(5): p. 817-25.
50. van Raaij, J.A., et al., *Effects of hexachlorobenzene and its metabolites pentachlorophenol and tetrachlorohydroquinone on serum thyroid hormone levels in rats*. Toxicology, 1991. 67(1): p. 107-16.
51. Theodoropoulos, T.J. and J.C. Zolman, *Effects of phenobarbital on hypothalamic-pituitary-thyroid axis in the rat*. Am J Med Sci, 1989. 297(4): p. 224-7.
52. McClain, R.M., et al., *The effect of phenobarbital on the metabolism and excretion of thyroxine in rats*. Toxicol Appl Pharmacol, 1989. 99(2): p. 216-28.
53. Hood, A., et al., *Sensitivity of thyroid gland growth to thyroid stimulating hormone (TSH) in rats treated with antithyroid drugs*. Toxicol Sci, 1999. 49(2): p. 263-71.
54. Benedetti, M.S., et al., *Alteration of thyroid hormone homeostasis by antiepileptic drugs in humans: involvement of glucuronosyltransferase induction*. Eur J Clin Pharmacol, 2005. 61(12): p. 863-72.
55. Liu, J., et al., *Alteration of thyroid homeostasis by UDP-glucuronosyltransferase inducers in rats: a dose-response study*. J Pharmacol Exp Ther, 1995. 273(2): p. 977-85.
56. Ohnhaus, E.E., et al., *The effect of antipyrine, phenobarbital and rifampicin on thyroid hormone metabolism in man*. Eur J Clin Invest, 1981. 11(5): p. 381-7.
57. Daminet, S. and D.C. Ferguson, *Influence of drugs on thyroid function in dogs*. J Vet Intern Med, 2003. 17(4): p. 463-72.
58. Larsen PR, D.T., Schlumberger MJ, Hay ID, *Thyroid physiology and diagnostic evaluation of patients with thyroid disorders*, in *Williams Textbook of Endocrinology*. 2002. p. 331-365.
59. Van Sande, J., et al., *Anion selectivity by the sodium iodide symporter*. Endocrinology, 2003. 144(1): p. 247-52.
60. Wolff, J., *Perchlorate and the thyroid gland*. Pharmacol Rev, 1998. 50(1): p. 89-105.
61. Pocar, P., et al., *AhR-agonist-induced transcriptional changes of genes involved in thyroid function in primary porcine thyrocytes*. Toxicol Sci, 2006. 89(2): p. 408-14.
62. Breous, E., A. Wenzel, and U. Loos, *The promoter of the human sodium/iodide symporter responds to certain phthalate plasticisers*. Mol Cell Endocrinol, 2005. 244(1-2): p. 75-8.

63. Divi, R.L. and D.R. Doerge, *Inhibition of thyroid peroxidase by dietary flavonoids*. Chem Res Toxicol, 1996. 9(1): p. 16-23.
64. Savu, L., *et al.*, *A senescence up-regulated protein: the rat thyroxine-binding globulin (TBG)*. Biochim Biophys Acta, 1991. 1097(1): p. 19-22.
65. Vranckx, R., *et al.*, *Characterization of a major development-regulated serum thyroxine-binding globulin in the euthyroid mouse*. Biochem J, 1990. 271(2): p. 373-9.
66. Jahnke, G.D., *et al.*, *Thyroid toxicants: assessing reproductive health effects*. Environ Health Perspect, 2004. 112(3): p. 363-8.
67. Nicoloff, J.T., *et al.*, *Simultaneous measurement of thyroxine and triiodothyronine peripheral turnover kinetics in man*. J Clin Invest, 1972. 51(3): p. 473-83.
68. Bartalena, L. and J. Robbins, *Variations in thyroid hormone transport proteins and their clinical implications*. Thyroid, 1992. 2(3): p. 237-45.
69. Mannavola, D., *et al.*, *TBG deficiency: description of two novel mutations associated with complete TBG deficiency and review of the literature*. J Mol Med, 2006. 84(10): p. 864-71.
70. Bhatkar, S.V., *et al.*, *Thyroid hormone binding protein abnormalities in patients referred for thyroid disorders*. Indian J Med Res, 2004. 120(3): p. 160-5.
71. Hurley, P.M., *Mode of carcinogenic action of pesticides inducing thyroid follicular cell tumors in rodents*. Environ Health Perspect, 1998. 106(8): p. 437-45.
72. Hard, G.C., *Recent developments in the investigation of thyroid regulation and thyroid carcinogenesis*. Environ Health Perspect, 1998. 106(8): p. 427-36.
73. Wu, K.M. and J.G. Farrelly, *Preclinical development of new drugs that enhance thyroid hormone metabolism and clearance: inadequacy of using rats as an animal model for predicting human risks in an IND and NDA*. Am J Ther, 2006. 13(2): p. 141-4.
74. De Pablo-Davila, F., *et al.*, *Study of the kinetics of the thyroid hormones and the peripheral conversion rate of thyroxine to triiodothyronine in acute renal insufficiency under experimental conditions*. Horm Metab Res, 1980. 12(10): p. 529-36.
75. Yokus, B. and U.D. Cakir, *Seasonal and physiological variations in serum chemistry and mineral concentrations in cattle*. Biol Trace Elem Res, 2006. 109(3): p. 255-66.
76. DiStefano, J.J., 3rd and D. Feng, *Comparative aspects of the distribution, metabolism, and excretion of six iodothyronines in the rat*. Endocrinology, 1988. 123(5): p. 2514-25.
77. Anai, H., *et al.*, *Activation of hypothalamic neuronal nitric oxide synthase in lithium-induced diabetes insipidus rats*. Psychoneuroendocrinology, 2001. 26(2): p. 109-20.
78. Sutherland, R.L. and M.W. Simpson-Morgan, *The thyroxine-binding properties of serum proteins. A competitive binding technique employing sephadex G-25*. J Endocrinol, 1975. 65(3): p. 319-32.

79. Van den Berg, K.J., *et al.*, *Interactions of halogenated industrial chemicals with transthyretin and effects on thyroid hormone levels in vivo*. Arch Toxicol, 1991. 65(1): p. 15-9.
80. Meerts, I.A., *et al.*, *Potent competitive interactions of some brominated flame retardants and related compounds with human transthyretin in vitro*. Toxicol Sci, 2000. 56(1): p. 95-104.
81. Cheek, A.O., *et al.*, *Potential mechanisms of thyroid disruption in humans: interaction of organochlorine compounds with thyroid receptor, transthyretin, and thyroid-binding globulin*. Environ Health Perspect, 1999. 107(4): p. 273-8.
82. van Raaij, J.A., K.J. van den Berg, and W.R. Notten, *Hexachlorobenzene and its metabolites pentachlorophenol and tetrachlorohydroquinone: interaction with thyroxine binding sites of rat thyroid hormone carriers ex vivo and in vitro*. Toxicol Lett, 1991. 59(1-3): p. 101-7.
83. van den Berg, K.J., *Interaction of chlorinated phenols with thyroxine binding sites of human transthyretin, albumin and thyroid binding globulin*. Chem Biol Interact, 1990. 76(1): p. 63-75.
84. Lans, M.C., *et al.*, *Different competition of thyroxine binding to transthyretin and thyroxine-binding globulin by hydroxy-PCBs, PCDDs and PCDFs*. Eur J Pharmacol, 1994. 270(2-3): p. 129-36.
85. Ulbrich, B. and R. Stahlmann, *Developmental toxicity of polychlorinated biphenyls (PCBs): a systematic review of experimental data*. Arch Toxicol, 2004. 78(5): p. 252-68.
86. Meerts, I.A., *et al.*, *Placental transfer of a hydroxylated polychlorinated biphenyl and effects on fetal and maternal thyroid hormone homeostasis in the rat*. Toxicol Sci, 2002. 68(2): p. 361-71.
87. Visser, W.E., *et al.*, *Thyroid hormone transport in and out of cells*. Trends Endocrinol Metab, 2008. 19(2): p. 50-6.
88. Hagenbuch, B., *Cellular entry of thyroid hormones by organic anion transporting polypeptides*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2007. 21(2): p. 209-21.
89. van der Deure, W.M., *et al.*, *Organic anion transporter 1B1: an important factor in hepatic thyroid hormone and estrogen transport and metabolism*. Endocrinology, 2008. 149(9): p. 4695-701.
90. Shimada, N. and K. Yamauchi, *Characteristics of 3,5,3'-triiodothyronine (T3)-uptake system of tadpole red blood cells: effect of endocrine-disrupting chemicals on cellular T3 response*. J Endocrinol, 2004. 183(3): p. 627-37.
91. Jigorel, E., *et al.*, *Differential regulation of sinusoidal and canalicular hepatic drug transporter expression by xenobiotics activating drug-sensing receptors in primary human hepatocytes*. Drug Metab Dispos, 2006. 34(10): p. 1756-63.
92. Guo, G.L., S. Choudhuri, and C.D. Klaassen, *Induction profile of rat organic anion transporting polypeptide 2 (oatp2) by prototypical drug-metabolizing enzyme inducers that*

activate gene expression through ligand-activated transcription factor pathways. J Pharmacol Exp Ther, 2002. 300(1): p. 206-12.

93. Zhang, J. and M.A. Lazar, *The mechanism of action of thyroid hormones.* Annu Rev Physiol, 2000. 62: p. 439-66.

94. Gauger, K.J., *et al.*, *Polychlorinated biphenyls (PCBs) exert thyroid hormone-like effects in the fetal rat brain but do not bind to thyroid hormone receptors.* Environ Health Perspect, 2004. 112(5): p. 516-23.

95. Zoeller, R.T., A.L. Dowling, and A.A. Vas, *Developmental exposure to polychlorinated biphenyls exerts thyroid hormone-like effects on the expression of RC3/neurogranin and myelin basic protein messenger ribonucleic acids in the developing rat brain.* Endocrinology, 2000. 141(1): p. 181-9.

96. Kitamura, S., *et al.*, *Thyroid hormone-like and estrogenic activity of hydroxylated PCBs in cell culture.* Toxicology, 2005. 208(3): p. 377-87.

97. Moriyama, K., *et al.*, *Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist.* J Clin Endocrinol Metab, 2002. 87(11): p. 5185-90.

98. Bianco, A.C., *et al.*, *Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases.* Endocr Rev, 2002. 23(1): p. 38-89.

99. Bianco, A.C. and B.W. Kim, *Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action.* J Clin Invest, 2006. 116(10): p. 2571-9.

100. Curran, P.G. and L.J. DeGroot, *The effect of hepatic enzyme-inducing drugs on thyroid hormones and the thyroid gland.* Endocr Rev, 1991. 12(2): p. 135-50.

101. Wu, S.Y., *et al.*, *Alternate pathways of thyroid hormone metabolism.* Thyroid, 2005. 15(8): p. 943-58.

102. Klaassen, C.D. and A.M. Hood, *Effects of microsomal enzyme inducers on thyroid follicular cell proliferation and thyroid hormone metabolism.* Toxicol Pathol, 2001. 29(1): p. 34-40.

103. Sewall, C.H., *et al.*, *Alterations in thyroid function in female Sprague-Dawley rats following chronic treatment with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin.* Toxicol Appl Pharmacol, 1995. 132(2): p. 237-44.

104. Schuur, A.G., *et al.*, *Extrathyroidal effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on thyroid hormone turnover in male Sprague-Dawley rats.* Endocrinology, 1997. 138(9): p. 3727-34.

105. Bastomsky, C.H., *Effects of a polychlorinated biphenyl mixture (aroclor 1254) and DDT on biliary thyroxine excretion in rats.* Endocrinology, 1974. 95(4): p. 1150-5.

106. de Sandro, V., *et al.*, *Male rat hepatic UDP-glucuronosyltransferase activity toward thyroxine. Activation and induction properties--relation with thyroxine plasma disappearance rate.* Biochem Pharmacol, 1992. 43(7): p. 1563-9.

107. Kato, Y., *et al.*, *Decrease in serum thyroxine level by phenobarbital in rats is not necessarily dependent on increase in hepatic UDP-glucuronosyltransferase*. *Drug Metab Dispos*, 2005. 33(11): p. 1608-12.
108. Spina, E., F. Pisani, and E. Perucca, *Clinically significant pharmacokinetic drug interactions with carbamazepine. An update*. *Clin Pharmacokinet*, 1996. 31(3): p. 198-214.
109. Anderson, G.D., *A mechanistic approach to antiepileptic drug interactions*. *Ann Pharmacother*, 1998. 32(5): p. 554-63.
110. Liu, L. and C.D. Klaassen, *Regulation of hepatic sulfotransferases by steroidal chemicals in rats*. *Drug Metab Dispos*, 1996. 24(8): p. 854-8.
111. Wang, L.Q. and M.O. James, *Inhibition of sulfotransferases by xenobiotics*. *Curr Drug Metab*, 2006. 7(1): p. 83-104.
112. Evans, P.J., *et al.*, *Circulating TSH levels measured with an immunochemiluminometric assay in patients taking drugs interfering with biochemical thyroid status*. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1987. 26(6): p. 717-21.
113. Sala, M., *et al.*, *Association between serum concentrations of hexachlorobenzene and polychlorobiphenyls with thyroid hormone and liver enzymes in a sample of the general population*. *Occup Environ Med*, 2001. 58(3): p. 172-7.
114. Hagmar, L., *et al.*, *Plasma concentrations of persistent organochlorines in relation to thyrotropin and thyroid hormone levels in women*. *Int Arch Occup Environ Health*, 2001. 74(3): p. 184-8.
115. Persky, V., *et al.*, *The effects of PCB exposure and fish consumption on endogenous hormones*. *Environ Health Perspect*, 2001. 109(12): p. 1275-83.
116. Schell, L.M., *et al.*, *Relationship of thyroid hormone levels to levels of polychlorinated biphenyls, lead, p,p'-DDE, and other toxicants in Akwesasne Mohawk youth*. *Environ Health Perspect*, 2008. 116(6): p. 806-13.
117. Langer, P., *et al.*, *Increased thyroid volume and prevalence of thyroid disorders in an area heavily polluted by polychlorinated biphenyls*. *Eur J Endocrinol*, 1998. 139(4): p. 402-9.
118. Hagmar, L., *et al.*, *Plasma levels of persistent organohalogenes and hormone levels in adult male humans*. *Arch Environ Health*, 2001. 56(2): p. 138-43.
119. Turyk, M.E., H.A. Anderson, and V.W. Persky, *Relationships of thyroid hormones with polychlorinated biphenyls, dioxins, furans, and DDE in adults*. *Environ Health Perspect*, 2007. 115(8): p. 1197-203.
120. Arisawa, K., H. Takeda, and H. Mikasa, *Background exposure to PCDDs/PCDFs/PCBs and its potential health effects: a review of epidemiologic studies*. *J Med Invest*, 2005. 52(1-2): p. 10-21.
121. Julander, A., *et al.*, *Polybrominated diphenyl ethers--plasma levels and thyroid status of workers at an electronic recycling facility*. *Int Arch Occup Environ Health*, 2005. 78(7): p. 584-92.

122. Mazdai, A., *et al.*, *Polybrominated diphenyl ethers in maternal and fetal blood samples*. Environ Health Perspect, 2003. 111(9): p. 1249-52.
123. Sandau, C.D., *et al.*, *Pentachlorophenol and hydroxylated polychlorinated biphenyl metabolites in umbilical cord plasma of neonates from coastal populations in Quebec*. Environ Health Perspect, 2002. 110(4): p. 411-7.
124. Wassermann, D., *et al.*, *Effect of organochlorine insecticides on serum PBI level in occupationally exposed people*. Bull Environ Contam Toxicol, 1971. 6(1): p. 85-8.
125. DeVito, M., *et al.*, *Screening methods for thyroid hormone disruptors*. Environ Health Perspect, 1999. 107(5): p. 407-15.
126. Dohler, K.D., C.C. Wong, and A. von zur Muhlen, *The rat as model for the study of drug effects on thyroid function: consideration of methodological problems*. Pharmacol Ther [B], 1979. 5(1-3): p. 305-18.
127. Hill, R.N., *et al.*, *Thyroid follicular cell carcinogenesis*. Fundam Appl Toxicol, 1989. 12(4): p. 629-97.
128. Knostman, K.A., S.M. Jhiang, and C.C. Capen, *Genetic alterations in thyroid cancer: the role of mouse models*. Vet Pathol, 2007. 44(1): p. 1-14.
129. Degitz, S.J., *et al.*, *Progress towards development of an amphibian-based thyroid screening assay using Xenopus laevis. Organismal and thyroidal responses to the model compounds 6-propylthiouracil, methimazole, and thyroxine*. Toxicol Sci, 2005. 87(2): p. 353-64.
130. Opitz, R., *et al.*, *Evaluation of histological and molecular endpoints for enhanced detection of thyroid system disruption in Xenopus laevis tadpoles*. Toxicol Sci, 2006. 90(2): p. 337-48.
131. Wright, M.L., *et al.*, *Anterior pituitary and adrenal cortical hormones accelerate or inhibit tadpole hindlimb growth and development depending on stage of spontaneous development or thyroxine concentration in induced metamorphosis*. J Exp Zool, 1994. 270(2): p. 175-88.
132. Fini, J.B., *et al.*, *An in vivo multiwell-based fluorescent screen for monitoring vertebrate thyroid hormone disruption*. Environ Sci Technol, 2007. 41(16): p. 5908-14.
133. Larsson, M., T. Pettersson, and A. Carlstrom, *Thyroid hormone binding in serum of 15 vertebrate species: isolation of thyroxine-binding globulin and prealbumin analogs*. Gen Comp Endocrinol, 1985. 58(3): p. 360-75.
134. Refetoff, S., N.I. Robin, and V.S. Fang, *Parameters of thyroid function in serum of 16 selected vertebrate species: a study of PBI, serum T4, free T4, and the pattern of T4 and T3 binding to serum proteins*. Endocrinology, 1970. 86(4): p. 793-805.
135. Ikeda, T., *et al.*, *Fipronil modulation of GABAA receptor single-channel currents*. Pest Manag Sci, 2004. 60(5): p. 487-92.
136. Rauh, J.J., S.C. Lummis, and D.B. Sattelle, *Pharmacological and biochemical properties of insect GABA receptors*. Trends Pharmacol Sci, 1990. 11(8): p. 325-9.

137. Tingle, C.C., *et al.*, *Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns*. Rev Environ Contam Toxicol, 2003. 176: p. 1-66.
138. McKernan, R.M. and P.J. Whiting, *Which GABAA-receptor subtypes really occur in the brain?* Trends Neurosci, 1996. 19(4): p. 139-43.
139. Ratra, G.S. and J.E. Casida, *GABA receptor subunit composition relative to insecticide potency and selectivity*. Toxicol Lett, 2001. 122(3): p. 215-22.
140. Ratra, G.S., S.G. Kamita, and J.E. Casida, *Role of human GABA(A) receptor beta3 subunit in insecticide toxicity*. Toxicol Appl Pharmacol, 2001. 172(3): p. 233-40.
141. Zhao, X., *et al.*, *Fipronil is a potent open channel blocker of glutamate-activated chloride channels in cockroach neurons*. J Pharmacol Exp Ther, 2004. 310(1): p. 192-201.
142. Ikeda, T., *et al.*, *Fipronil modulation of glutamate-induced chloride currents in cockroach thoracic ganglion neurons*. Neurotoxicology, 2003. 24(6): p. 807-15.
143. Tang, J., *et al.*, *In vitro metabolism of fipronil by human and rat cytochrome P450 and its interactions with testosterone and diazepam*. Chem Biol Interact, 2004. 147(3): p. 319-29.
144. Hainzl, D. and J.E. Casida, *Fipronil insecticide: novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(23): p. 12764-7.
145. Hainzl, D., L.M. Cole, and J.E. Casida, *Mechanisms for selective toxicity of fipronil insecticide and its sulfone metabolite and desulfinyl photoproduct*. Chem Res Toxicol, 1998. 11(12): p. 1529-35.
146. Zhao, X., *et al.*, *Sulfone metabolite of fipronil blocks gamma-aminobutyric acid- and glutamate-activated chloride channels in mammalian and insect neurons*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. 314(1): p. 363-73.
147. AFSSA, *Évaluation des risques pour la santé humaine liés à une exposition au fipronil*. 2005.
148. Das, P.C., *et al.*, *Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes*. Chem Biol Interact, 2006. 164(3): p. 200-14.
149. Ohi, M., *et al.*, *Reproductive adverse effects of fipronil in Wistar rats*. Toxicol Lett, 2004. 146(2): p. 121-7.
150. FAO/WHO, *Pesticide Residues in Food-Fipronil*. 1997.
151. Jennings, K.A., *et al.*, *Human exposure to fipronil from dogs treated with frontline*. Vet Hum Toxicol, 2002. 44(5): p. 301-3.
152. Dahl, G.E., *et al.*, *A central negative feedback action of thyroid hormones on thyrotropin-releasing hormone secretion*. Endocrinology, 1994. 135(6): p. 2392-7.
153. FDA, *Guidance for industry - Bioanalytical Method Validation*. 2001.

154. Yamaoka, K., T. Nakagawa, and T. Uno, *Application of Akaike's information criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations*. J Pharmacokinet Biopharm, 1978. 6(2): p. 165-75.
155. Abend, S.L., et al., *Rapid alteration in circulating free thyroxine modulates pituitary type II 5' deiodinase and basal thyrotropin secretion in the rat*. J Clin Invest, 1991. 88(3): p. 898-903.
156. Liddle, C., et al., *Separate and interactive regulation of cytochrome P450 3A4 by triiodothyronine, dexamethasone, and growth hormone in cultured hepatocytes*. J Clin Endocrinol Metab, 1998. 83(7): p. 2411-6.
157. Oinonen, T. and K.O. Lindros, *Zonation of hepatic cytochrome P-450 expression and regulation*. Biochem J, 1998. 329 (Pt 1): p. 17-35.
158. Masmoudi, T., et al., *Transcriptional regulation by triiodothyronine of the UDP-glucuronosyltransferase family 1 gene complex in rat liver. Comparison with induction by 3-methylcholanthrene*. J Biol Chem, 1997. 272(27): p. 17171-5.
159. Li, Y.Q., et al., *The effect of hormones on the expression of five isoforms of UDP-glucuronosyltransferase in primary cultures of rat hepatocytes*. Pharm Res, 1999. 16(2): p. 191-7.
160. Vranckx, R., et al., *Regulation of rat thyroxine-binding globulin and transthyretin: studies in thyroidectomized and hypophysectomized rats given tri-iodothyronine or/and growth hormone*. J Endocrinol, 1994. 142(1): p. 77-84.
161. Chopra, I.J., J. Sack, and D.A. Fisher, *3,3',5'-Triiodothyronine (reverse T3) and 3,3',5-triiodothyronine (T3) in fetal and adult sheep: studies of metabolic clearance rates, production rates, serum binding, and thyroidal content relative to thyroxine*. Endocrinology, 1975. 97(5): p. 1080-8.
162. Yamada, H., et al., *Steady-state regulation of whole-body thyroid hormone pool sizes and interconversion rates in hypothyroid and moderately T3-stimulated rats*. Endocrinology, 1996. 137(12): p. 5624-33.
163. Silva, J.E., et al., *Qualitative and quantitative differences in the pathways of extrathyroidal triiodothyronine generation between euthyroid and hypothyroid rats*. J Clin Invest, 1984. 73(4): p. 898-907.
164. Vogel, J., *Measurement of cardiac output in small laboratory animals using recordings of blood conductivity*. Am J Physiol, 1997. 273(5 Pt 2): p. H2520-7.
165. Toutain, P.L. and A. Bousquet-Melou, *Plasma clearance*. J Vet Pharmacol Ther, 2004. 27(6): p. 415-25.
166. Hood, A., R. Hashmi, and C.D. Klaassen, *Effects of microsomal enzyme inducers on thyroid-follicular cell proliferation, hyperplasia, and hypertrophy*. Toxicol Appl Pharmacol, 1999. 160(2): p. 163-70.
167. Tanaka, E., et al., *The effect of indomethacin on hepatic drug-oxidizing capacity in the rat: trimethadione and antipyrine metabolism as an indicator*. J Pharmacobiodyn, 1985. 8(9): p. 773-9.

168. Matthew, D.E. and J.B. Houston, *Drug metabolizing capacity in vitro and in vivo--II. Correlations between hepatic microsomal monooxygenase markers in phenobarbital-induced rats*. *Biochem Pharmacol*, 1990. 40(4): p. 751-8.
169. Visser, T.J., *et al.*, *Glucuronidation of thyroid hormone in rat liver: effects of in vivo treatment with microsomal enzyme inducers and in vitro assay conditions*. *Endocrinology*, 1993. 133(5): p. 2177-86.
170. Zalko, D., *et al.*, *Biotransformation of the flame retardant tetrabromo-bisphenol A by human and rat sub-cellular liver fractions*. *Chemosphere*, 2006. 64(2): p. 318-27.
171. Lowry, O.H., *et al.*, *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. *J Biol Chem*, 1951. 193(1): p. 265-75.
172. Szakacs, T., Z. Veres, and L. Vereczkey, *Effect of phenobarbital and spironolactone treatment on the oxidative metabolism of antipyrine by rat liver microsomes*. *Pol J Pharmacol*, 2001. 53(1): p. 11-9.
173. Balani, S.K., *et al.*, *Effective dosing regimen of 1-aminobenzotriazole for inhibition of antipyrine clearance in rats, dogs, and monkeys*. *Drug Metab Dispos*, 2002. 30(10): p. 1059-62.
174. Ikushiro, S., Y. Emi, and T. Iyanagi, *Activation of glucuronidation through reduction of a disulfide bond in rat UDP-glucuronosyltransferase 1A6*. *Biochemistry*, 2002. 41(42): p. 12813-20.
175. Wong, H., *et al.*, *Increased hepatobiliary clearance of unconjugated thyroxine determines DMP 904-induced alterations in thyroid hormone homeostasis in rats*. *Toxicol Sci*, 2005. 84(2): p. 232-42.
176. Mohamed, F., *et al.*, *Acute human self-poisoning with the N-phenylpyrazole insecticide fipronil--a GABAA-gated chloride channel blocker*. *J Toxicol Clin Toxicol*, 2004. 42(7): p. 955-63.
177. St Peter, J.V. and W.M. Awni, *Quantifying hepatic function in the presence of liver disease with phenazone (antipyrine) and its metabolites*. *Clin Pharmacokinet*, 1991. 20(1): p. 50-65.
178. Carcillo, J.A., *et al.*, *Cytochrome P450 mediated-drug metabolism is reduced in children with sepsis-induced multiple organ failure*. *Intensive Care Med*, 2003. 29(6): p. 980-4.
179. Shetty, S.N., J.A. Himes, and G.T. Edds, *Enzyme induction in sheep: effects of phenobarbital on in vivo and in vitro drug metabolism*. *Am J Vet Res*, 1972. 33(5): p. 935-42.
180. Hecker, J.F., *The sheep as an experimental animal*. Academic press Inc. Londres ed. 1983.
181. Offiah, V.N., *et al.*, *Effects of triiodothyronine treatment on pharmacokinetic properties and metabolite formation of antipyrine in dwarf goats*. *Am J Vet Res*, 1992. 53(8): p. 1354-6.

182. Hays, M.T., M.R. Broome, and J.M. Turrel, *A multicompartmental model for iodide, thyroxine, and triiodothyronine metabolism in normal and spontaneously hyperthyroid cats*. *Endocrinology*, 1988. 122(6): p. 2444-61.
183. Tufenkji, A.E., *et al.*, *Incidence of a subclinical fascioliasis on antipyrine clearance and metabolite excretion in sheep*. *Xenobiotica*, 1988. 18(4): p. 357-64.
184. Li, P. and G. Akk, *The insecticide fipronil and its metabolite fipronil sulphone inhibit the rat alpha1beta2gamma2L GABA(A) receptor*. *Br J Pharmacol*, 2008.
185. Fekete, C., *et al.*, *GABA-ergic innervation of thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat*. *Brain Res*, 2002. 957(2): p. 251-8.
186. Smyth, *Limma : linear models for microarray data*, in *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*, Springer, Editor. 2005: New York. p. 397-420.
187. Crespel, A., *et al.*, *Effects of glucagon and glucagon-like peptide-1-(7-36) amide on C cells from rat thyroid and medullary thyroid carcinoma CA-77 cell line*. *Endocrinology*, 1996. 137(9): p. 3674-80.
188. Berasain, C., *et al.*, *Amphiregulin: a new growth factor in hepatocarcinogenesis*. *Cancer Lett*, 2007. 254(1): p. 30-41.
189. Garcia-Jimenez, C. and P. Santisteban, *TSH signalling and cancer*. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 2007. 51(5): p. 654-71.
190. Hochol, A., *et al.*, *Expression of neuropeptides B and W and their receptors in endocrine glands of the rat*. *Int J Mol Med*, 2006. 18(6): p. 1101-6.
191. Heo, H.S., *et al.*, *Microarray profiling of genes differentially expressed during erythroid differentiation of murine erythroleukemia cells*. *Mol Cells*, 2005. 20(1): p. 57-68.
192. Kogai, T., K. Taki, and G.A. Brent, *Enhancement of sodium/iodide symporter expression in thyroid and breast cancer*. *Endocr Relat Cancer*, 2006. 13(3): p. 797-826.
193. Filetti, S., *et al.*, *Sodium/iodide symporter: a key transport system in thyroid cancer cell metabolism*. *Eur J Endocrinol*, 1999. 141(5): p. 443-57.
194. Siegel, D. and D. Ross, *Immunodetection of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in human tissues*. *Free Radic Biol Med*, 2000. 29(3-4): p. 246-53.
195. Bifulco, M., *et al.*, *Control by the endogenous cannabinoid system of ras oncogene-dependent tumor growth*. *Faseb J*, 2001. 15(14): p. 2745-7.
196. Portella, G., *et al.*, *Inhibitory effects of cannabinoid CB1 receptor stimulation on tumor growth and metastatic spreading: actions on signals involved in angiogenesis and metastasis*. *Faseb J*, 2003. 17(12): p. 1771-3.
197. Bierhaus, A., *et al.*, *AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept*. *Cardiovasc Res*, 1998. 37(3): p. 586-600.

198. Yang, Y., *et al.*, *Members of the fatty acid binding protein family are differentiation factors for the mammary gland.* J Cell Biol, 1994. 127(4): p. 1097-109.
199. Gao, B. and G. Kunos, *Isolation and characterization of the gene encoding the rat alpha 1B adrenergic receptor.* Gene, 1993. 131(2): p. 243-7.
200. Kanasaki, M., *et al.*, *cAMP responsive element-mediated regulation of the gene transcription of the alpha 1B adrenergic receptor by thyrotropin.* J Clin Invest, 1994. 94(6): p. 2245-54.
201. Shimura, H., T. Endo, and T. Onaya, *Thyrotrophin increases the alpha 1b-adrenergic receptors in rat thyroid gland in vivo.* J Endocrinol, 1990. 126(2): p. 317-22.
202. Smith, T.J., *et al.*, *Prostaglandin-endoperoxide H synthase-2 expression in human thyroid epithelium. Evidence for constitutive expression in vivo and in cultured KAT-50 cells.* J Biol Chem, 1999. 274(22): p. 15622-32.
203. Tahara, K., *et al.*, *Regulation of prostaglandin synthesis by thyrotropin, insulin or insulin-like growth factor-I, and serum in FRTL-5 rat thyroid cells.* J Biol Chem, 1991. 266(1): p. 440-8.
204. Medina, D.L., *et al.*, *RhoA activation promotes transformation and loss of thyroid cell differentiation interfering with thyroid transcription factor-1 activity.* Mol Endocrinol, 2002. 16(1): p. 33-44.
205. Suzuki, K., *et al.*, *Autoregulation of thyroid-specific gene transcription by thyroglobulin.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(14): p. 8251-6.
206. Eskandari, S., *et al.*, *Thyroid Na⁺/I⁻ symporter. Mechanism, stoichiometry, and specificity.* J Biol Chem, 1997. 272(43): p. 27230-8.
207. Kretschmer, X.C. and W.S. Baldwin, *CAR and PXR: xenosensors of endocrine disrupters?* Chem Biol Interact, 2005. 155(3): p. 111-28.
208. Qatanani, M., J. Zhang, and D.D. Moore, *Role of the constitutive androstane receptor in xenobiotic-induced thyroid hormone metabolism.* Endocrinology, 2005. 146(3): p. 995-1002.
209. Lemaire, G., *et al.*, *Identification of new human pregnane X receptor ligands among pesticides using a stable reporter cell system.* Toxicol Sci, 2006. 91(2): p. 501-9.
210. Jordan, D., *et al.*, *Role of GABA in the control of thyrotropin secretion in the rat.* Brain Res, 1983. 268(1): p. 105-10.
211. Verma, P.S., J. Adir, and R.L. Miller, *Effect of experimental hyperthyroidism on atropine pharmacokinetics in sheep.* Methods Find Exp Clin Pharmacol, 1990. 12(2): p. 115-8.
212. Jacobs, G., *et al.*, *Pharmacokinetics of propranolol in healthy cats during euthyroid and hyperthyroid states.* Am J Vet Res, 1997. 58(4): p. 398-403.
213. Zaragoza, A., *et al.*, *Potentiation of thioacetamide hepatotoxicity by phenobarbital pretreatment in rats. Inducibility of FAD monooxygenase system and age effect.* Chem Biol Interact, 2000. 124(2): p. 87-101.

214. Cooper, B.W., *et al.*, *Phthalate induction of CYP3A4 is dependent on glucocorticoid regulation of PXR expression*. *Toxicol Sci*, 2008. 103(2): p. 268-77.
215. Asamoto, M., *et al.*, *Strain differences in susceptibility to 2-acetylaminofluorene and phenobarbital promotion of hepatocarcinogenesis: immunohistochemical analysis of cytochrome P-450 isozyme induction by 2-acetylaminofluorene and phenobarbital*. *Jpn J Cancer Res*, 1989. 80(11): p. 1041-6.
216. White, I.N., *et al.*, *Induction of CYP2B1 and 3A1, and associated monooxygenase activities by tamoxifen and certain analogues in the livers of female rats and mice*. *Biochem Pharmacol*, 1993. 45(1): p. 21-30.
217. Souma, S., M. Sekimoto, and M. Degawa, *Species difference in the induction of hepatic CYP1A subfamily enzymes, especially CYP1A2, by 2-methoxy-4-nitroaniline among rats, mice, and guinea pigs*. *Arch Toxicol*, 2006. 80(11): p. 739-47.

TITLE : Evaluation of the potential thyroid disrupting effects of fipronil in two species : the rat and the sheep

SUMMARY : The evaluation of fipronil toxicity toward thyroid function for human is impeded by the absence in the adult rat of the thyroxine-binding globulin, the main specific binding protein of thyroid hormones in human. The goal of this study is to reevaluate the pathophysiological scheme of fipronil in a more relevant species toward human.

In the rat, the thyroid disrupting effects of fipronil were confirmed and linked to a hepatic enzyme induction leading to an increased thyroxine clearance. The identification of the genes differently expressed in the thyroid under fipronil treatment by a transcriptomic approach is relevant with an increased secretion of thyrotropin.

None of these effects were observed in the sheep which expresses thyroxine-binding globulin, except a moderate increase in the clearance of free thyroxine. This interspecies difference in fipronil effects was linked to the quantitative differences in fipronil metabolism between these two species.

KEYWORDS : rat, sheep, fipronil, insecticide, endocrine disruptor, thyroid function, thyroxine-binding globulin

AUTEUR : Julien LEGHAIT

TITRE : Evaluation du potentiel perturbateur thyroïdien du fipronil
chez deux espèces : le rat et le mouton

DIRECTEURS DE THESE : Madame le Docteur Catherine VIGUIE
Madame le Professeur Véronique GAYRARD

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE :

le 15 Décembre 2008 à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

RESUME : L'évaluation de la toxicité thyroïdienne du fipronil chez l'homme est entravée par le défaut d'expression chez le rat adulte de la thyroxine-binding globulin, principale protéine de liaison spécifique des hormones thyroïdiennes chez l'homme. Le but de ce travail est de réévaluer le schéma physiopathologique du fipronil dans une espèce plus pertinente par rapport à l'homme.

Les effets perturbateurs thyroïdiens chez le rat ont été confirmés et reliés à une induction enzymatique hépatique induisant une augmentation de la clairance de la thyroxine. L'identification, par une approche transcriptomique, des gènes différentiellement exprimés dans la thyroïde sous traitement au fipronil, est cohérente avec une hypersécrétion de thyrotropine.

Aucun des effets obtenus chez le rat n'a été observé chez le mouton, espèce exprimant la thyroxine-binding globulin, excepté une augmentation modérée de la clairance de la thyroxine libre. Cette divergence d'effet a été reliée aux différences quantitatives de métabolisation du fipronil entre les deux espèces.

MOTS-CLES : rat, mouton, fipronil, insecticide, perturbateur endocrinien, fonction thyroïdienne, thyroxine-binding globulin

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Pathologie, toxicologie, génétique et nutrition

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :

UMR181 Physiopathologie et Toxicologie Expérimentales, INRA, ENVT
Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
23 chemin des Capelles
BP 87614
31076 Toulouse Cedex 3