

PERTINENCE DU MODÈLE OVIN PAR RAPPORT AU MODÈLE RAT POUR L'ÉTUDE DE LA TOXICITÉ THYROÏDIENNE DU FIPRONIL

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement en 2006
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Noémie COCHARD

Née, le 22 mars 1981 à VILLEDIEU LES POELES (Manche)

Directeur de thèse : Mme le Docteur Véronique GAYRARD-TROY

JURY

PRESIDENT :

M. Jean-Marc SOULAT

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESSEUR :

Mme Véronique GAYRARD-TROY
Mme Nicole HAGEN-PICARD

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :

Mlle Catherine VIGUIÉ

Docteur Vétérinaire

MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur	: M.	A. MILON
Directeurs honoraires	M.	G. VAN HAVERBEKE
	M.	J. FERNEY
	M.	P. DESNOYERS
Professeurs honoraires	M.	L. FALIU
	M.	C. LABIE
	M.	C. PAVAU
	M.	F. LESCURE
	M.	A. RICO
	M.	D. GRIESS
	M.	A. CAZIEUX
	Mme	V. BURGAT
	M.	J. CHANTAL
	M.	J.-F. GUELF
	M.	M. ECKHOUTTE

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

M.	BRAUN Jean-Pierre, <i>Physique et Chimie biologiques et médicales</i>
M.	CABANIE Paul, <i>Histologie, Anatomie pathologique</i>
M.	DARRE Roland, <i>Productions animales</i>
M.	DORCHIES Philippe, <i>Parasitologie et Maladies Parasitaires</i>
M.	EUZEBY Jean, <i>Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie</i>
M.	TOUTAIN Pierre-Louis, <i>Physiologie et Thérapeutique</i>

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

M.	AUTEFAGE André, <i>Pathologie chirurgicale</i>
M.	BODIN ROZAT DE MANDRES NEGRE Guy, <i>Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie</i>
M.	DELVERDIER Maxence, <i>Anatomie pathologique</i>
M.	ENJALBERT Francis, <i>Alimentation</i>
M.	FRANC Michel, <i>Parasitologie et Maladies Parasitaires</i>
M.	HENROTEAUX Marc, <i>Médecine des carnivores</i>
M.	MARTINEAU Guy-Pierre, <i>Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour</i>
M.	PETIT Claude, <i>Pharmacie et Toxicologie</i>
M.	REGNIER Alain, <i>Physiopathologie oculaire</i>
M.	SAUTET Jean, <i>Anatomie</i>
M.	SCHELCHER François, <i>Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour</i>

PROFESSEURS 2^e CLASSE

Mme	BENARD Geneviève, <i>Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale</i>
M.	BERTHELOT Xavier, <i>Pathologie de la Reproduction</i>
M.	CONCORDET Didier, <i>Mathématiques, Statistiques, Modélisation</i>
M.	CORPET Denis, <i>Science de l'Aliment et Technologies dans les industries agro-alimentaires</i>
M.	DUCOS Alain, <i>Zootéchnie</i>
M.	DUCOS de LAHITTE Jacques, <i>Parasitologie et Maladies parasitaires</i>
M.	GUERRE Philippe, <i>Pharmacie et Toxicologie</i>
Mme	KOLF-CLAUW Martine, <i>Pharmacie - Toxicologie</i>
M.	LEFEBVRE Hervé, <i>Physiologie et Thérapeutique</i>
M.	LIGNEREUX Yves, <i>Anatomie</i>
M.	PICAVET Dominique, <i>Pathologie infectieuse</i>

INGENIEUR DE RECHERCHES

M.	TAMZALI Youssef, <i>Responsable Clinique équine</i>
----	---

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

Mme	MICHAUD Françoise, <i>Professeur d'Anglais</i>
M.	SEVERAC Benoît, <i>Professeur d'Anglais</i>

MAÎTRE DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. JOUGLAR Jean-Yves, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

MAÎTRES DE CONFERENCES CLASSE NORMALE

M. ASIMUS Erik, *Pathologie chirurgicale*
M. BAILLY Jean-Denis, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. BERGONIER Dominique, *Pathologie de la Reproduction*
M. BERTAGNOLI Stéphane, *Pathologie infectieuse*
Mme BOUCRAUT-BARALON Corine, *Pathologie infectieuse*
Mlle BOULLIER Séverine, *Immunologie générale et médicale*
Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. BOUSQUET-MELOU Alain, *Physiologie et Thérapeutique*
Mme BRET-BENNIS Lydie, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. BRUGERE Hubert, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
Mlle CADIERGUES Marie-Christine, *Dermatologie*
Mme CAMUS-BOUCLAINVILLE Christelle, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mme COLLARD-MEYNAUD Patricia, *Pathologie chirurgicale*
Mlle DIQUELOU Armelle, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. DOSSIN Olivier, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. FOUCRAS Gilles, *Pathologie du bétail*
Mme GAYRARD-TROY Véronique, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. GUERIN Jean-Luc, *Elevage et Santé Avicoles et Cunicoles*
Mme HAGEN-PICARD Nicole, *Pathologie de la Reproduction*
M. JACQUIET Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. JAEG Jean-Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*
M. LYAZRHI Faouzi, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. MATHON Didier, *Pathologie chirurgicale*
M. MEYER Gilles, *Pathologie des ruminants*
Mme MEYNADIER-TROEGELER Annabelle, *Alimentation*
M. MONNEREAU Laurent, *Anatomie, Embryologie*
Mme PRIYMENKO Nathalie, *Alimentation*
Mme RAYMOND-LETRON Isabelle, *Anatomie pathologique*
M. SANS Pierre, *Productions animales*
Mlle TRUMEL Catherine, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*
M. VERWAERDE Patrick, *Anesthésie, Réanimation*

MAÎTRES DE CONFERENCES CONTRACTUELS

Mlle BIBBAL Delphine, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. CASSARD Hervé, *Pathologie du bétail*
M. DESMAIZIERES Louis-Marie, *Clinique équine*
Mlle LE MINOR Odile, *Epidémiologie*
M. NOUVEL Laurent-Xavier, *Pathologie de la reproduction*
M. REYNOLDS Brice, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*
M. VOLMER Romain, *Infectiologie*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

M. CONCHOU Fabrice, *Imagerie médicale*
M. CORBIERE Fabien, *Pathologie des ruminants*
Mlle LACROUX Caroline, *Anatomie pathologique des animaux de rente*
M. MOGICATO Giovanni, *Anatomie, Imagerie médicale*
Mlle PALIERNE Sophie, *Chirurgie des animaux de compagnie*

A notre Président de thèse,

Monsieur le Professeur Soulat

Professeur des universités

Praticien Hospitalier, CHU de Toulouse

Service de maladies professionnelles et environnementales

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

A notre jury de thèse :

Madame le Docteur Gayrard-Troy,

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Physiologie de la reproduction, Endocrinologie

Qui nous a confié ce travail et nous a guidé dans son élaboration,
Sincère reconnaissance.

Madame le Docteur Hagen-Picard

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie de la reproduction

Qui nous fait l'honneur de participer à ce jury de thèse,
Sincères remerciements.

A Madame le Docteur Viguié,

Chargée de Recherche, INRA

Qui nous a guidé dans l'élaboration de ce travail, pour sa grande disponibilité, ses conseils et ses encouragements,
Sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Toutain,

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Physiologie et Thérapeutique

Qui a eu l'amabilité de relire notre travail et de nous donner de précieux conseils.
Sincères remerciements.

A tous ceux que j'aime, ai aimé ou aimerai...

A Ludo, mon évidence

Sommaire

Sommaire	1
Table des illustrations	3
Introduction	7
Première partie : Partie bibliographique	9
I. L'axe hypothalamo-hypophysaire thyroïdien	9
I.1. Eléments de physiologie thyroïdienne	9
I.1.1. La stimulation de la fonction thyroïdienne	9
I.1.2. La synthèse et la sécrétion des hormones thyroïdiennes	9
I.1.3. L'utilisation des hormones thyroïdiennes	10
I.1.4. Le catabolisme et l'élimination des hormones thyroïdiennes	10
I.1.5. La régulation de la fonction thyroïdienne	12
I.2. Variations interspécifiques de physiologie thyroïdienne	13
II. Les perturbateurs thyroïdiens	15
II.1. Les mécanismes d'action potentiels des perturbateurs thyroïdiens	15
II.2. Les principales molécules qui perturbent la fonction thyroïdienne et leurs mécanismes d'action	16
II.3. Les conséquences sur l'organisme des perturbations thyroïdiennes	18
II.3.1. L'apparition de troubles fonctionnels	18
II.3.2. La carcinogénèse thyroïdienne	18
III. Le fipronil	20
III.1. Structure	20
III.2. Activité	20
III.3. Le fipronil et ses mécanismes d'action sur la fonction thyroïdienne	21
III.4. Métabolisme	22
Deuxième partie : Partie expérimentale	25
I. Détermination de l'exposition de rats au fipronil lors d'un traitement associé à des perturbations de la fonction thyroïdienne	25
I. 1. Matériels et méthodes	25
I.1.1. Animaux	25
I.1.2. Produit, préparation et administration	25
I.1.3. Schéma expérimental	26
I.1.4. Techniques de prélèvement	26

I.1.5. Dosages	27
I.1.5.1. Dosage du fipronil et du fipronil sulfone	27
I.1.5.2. Dosages hormonaux	28
I.1.6. Analyse des données	29
I.2. Résultats	30
I.2.1. Suivi des poids des rats	30
I.2.2. Ingestion du fipronil	31
I.2.3. Concentrations plasmatiques du fipronil et du fipronil sulfone chez les rats	32
I.2.3.1. Concentration plasmatique du fipronil chez les rats	32
I.2.3.2. Concentration plasmatique du fipronil sulfone chez les rats	33
I.2.4. Résultats des dosages hormonaux	34
I.2.4.1. Concentrations plasmatiques de triiodothyronine (T3) et de thyroxine(T4)	34
I.2.4.2. Concentration plasmatique en TSH	38
II. Pharmacocinétique du fipronil chez les ovins : détermination d'un schéma posologique	39
II.1. Matériels et méthodes	39
II.1.1. Animaux	39
II.1.2. Produit, préparation et administration	39
II.1.3. Schéma expérimental	39
II.1.4. Techniques de prélèvement	39
II.1.5. Techniques de dosage du fipronil et du fipronil sulfone	39
II.1.6. Analyse des données	40
II.1.6.1. Analyse des données pharmacocinétiques du fipronil	40
II.1.6.2. Analyse des données pharmacocinétiques du fipronil sulfone	41
II.2. Résultats	43
II.2.1. Paramètres pharmacocinétiques du fipronil et du fipronil sulfone	43
II.2.1.1. Paramètres pharmacocinétiques du fipronil chez le mouton	43
II.2.1.2. Paramètres pharmacocinétiques du fipronil sulfone chez le mouton	45
II.2.1.3. Evolution des concentrations plasmatiques du fipronil et du fipronil sulfone en fonction du temps chez la brebis	46
II.2.2. Détermination d'un schéma posologique chez le mouton	47
Troisième partie : Discussion	49
Conclusion	55
Bibliographie	57

Table des illustrations

<u>Figure 1</u> : Les différentes voies du catabolisme des hormones thyroïdiennes.	10
<u>Figure 2</u> : Les voies de régulation de la fonction thyroïdienne.	12
<u>Figure 3</u> : Structure chimique du fipronil.	20
<u>Figure 4</u> : Les voies de métabolisation du fipronil chez le rat (D'après AFSSA, www.afssa.fr/ftp/afssa/basedoc/Rapportfipro.pdf , 2005).	22
<u>Figure 5</u> : Evolution des poids corporels moyens (\pm ET) des lots de rats traités au fipronil par voie orale (30mg/kg d'aliment) sur une période de 28 jours et des lots de rats contrôles, pesés hebdomadairement (en grammes).	30
<u>Figure 6</u> : Evolution de l'ingestion moyenne d'aliment (\pm ET) des lots de rats traités au fipronil par voie orale (30mg/kg d'aliment) sur une période de 28 jours et des lots de rats contrôles, mesurée quotidiennement (en grammes).	31
<u>Figure 7</u> : Evolution de la dose ingérée moyenne de fipronil (\pm ET) par les rats traités au fipronil par voie orale (30mg/kg d'aliment) sur une période de 28 jours, évaluée quotidiennement (mg/kg).	31
<u>Figure 8</u> : Fréquence de répartition par classe de concentration plasmatique en fipronil. Les concentrations ont été mesurées, après 28 jours, chez des rats traités au fipronil par voie orale (30mg/kg d'aliment).	32
<u>Figure 9</u> : Concentrations plasmatiques moyennes de fipronil sulfone (\pm ET) par lot de rat en fonction du moment de la journée. Les concentrations plasmatiques en fipronil sulfone ont été mesurées chez des rats traités au fipronil par voie orale (30mg/kg d'aliment) pendant une période de 28 jours. Un lot de rats était sacrifié toutes les 4 heures à partir de 10 h à J28.	33
<u>Figure 10</u> : Concentrations plasmatiques (\pm ET) de thyroxine totale (TT4) en fonction du moment de la journée : Les concentrations ont été mesurées chez des rats traités au fipronil par voie orale (30mg/kg d'aliment) pendant une période de 28 jours puis sacrifiés toutes les 4 heures pendant 24 heures et chez des rats contrôles sacrifiés toutes les 8 heures.	34
<u>Figure 11</u> : Concentrations plasmatiques (\pm ET) de thyroxine libre (FT4) en fonction du moment de la journée : Les concentrations ont été mesurées chez des rats traités au fipronil par voie orale (30mg/kg d'aliment) pendant une période de 28 jours puis sacrifiés toutes les 4 heures pendant 24 heures et chez des rats contrôles sacrifiés toutes les 8 heures.	34
<u>Figure 12</u> : Concentrations plasmatiques (\pm ET) de triiodothyronine totale (TT3) en fonction du moment de la journée : Les concentrations ont été mesurées chez des rats traités au fipronil par voie orale (30mg/kg d'aliment) pendant une période de 28 jours puis sacrifiés toutes les 4 heures pendant 24 heures et chez des rats contrôles sacrifiés toutes les 8 heures.	35
<u>Figure 13</u> : Concentrations plasmatiques (\pm ET) de triiodothyronine libre (FT3) en fonction du moment de la journée : Les concentrations ont été mesurées chez des rats traités au fipronil par voie orale (30mg/kg d'aliment) pendant une période de 28 jours puis sacrifiés toutes les 4 heures pendant 24 heures et chez des rats contrôles sacrifiés toutes les 8 heures.	36

Figure 14 : Concentrations plasmatiques (\pm ET) de TSH** (Thyroid Stimulating Hormone) chez les rats traités au fipronil par voie orale (30 mg/kg d'aliment) pendant une période de 28 jours et chez les rats contrôles non traités. 38

Figure 15 : Modèle compartimental de la cinétique du fipronil chez le mouton. 40

Figure 16 : Modèle compartimental de la cinétique du fipronil sulfone chez le mouton. 42

Figure 17 : Courbes de décroissance des valeurs observées et des valeurs prédites des concentrations plasmatiques de fipronil en fonction du temps, chez 2 brebis ayant reçu un bolus IV de fipronil (1mg/kg) à t0. 43

Figure 18 : Courbes de décroissance des valeurs observées et des valeurs prédites des concentrations plasmatiques de fipronil sulfone en fonction du temps, chez 2 brebis ayant reçu un bolus IV de fipronil (1mg/kg) à t0. 45

Figure 19 : Evolution des concentrations plasmatiques (ng/mL) de fipronil et de fipronil sulfone en échelle logarithmique, au cours du temps, après injection d'un bolus IV de 1mg/kg, chez un sujet représentatif. La limite de quantification est de 1 ng/mL pour le fipronil et pour le fipronil sulfone. 46

Figure 20 : Simulation de l'évolution des concentrations plasmatiques en fipronil (ng/mL) pour une administration quotidienne de 0,5 mg/kg de fipronil par voie intra-veineuse, chez le mouton. 48

Tableau 1 : Variation des paramètres de la fonction thyroïdienne chez l'homme, le rat, et le mouton (D'après Refetoff et al., 1970). Les valeurs de l'étude étant homogènes, les valeurs présentées sont les moyennes des valeurs de l'étude. 13

Tableau 2 : Variations de la nature des protéines de transport de la thyroxine chez l'homme, le rat et le mouton (D'après Sutherland et al., 1975). 14

Tableau 3 : Affinité variable des protéines de transport pour la thyroxine chez l'homme, le rat et le mouton (D'après Sutherland et al., 1975). 15

Tableau 4 : Capacité variable des protéines de transport de la thyroxine chez l'homme, le rat et le mouton (D'après Sutherland et al., 1975). 15

Tableau 5 : Sélectivité des dérivés du fipronil et d'un polychlorocycloalcane, comme inhibiteurs de la fixation in vitro de [³H]EBOB (4-ethynyl-4-n-[2,3-³H₂]-propylbicycloorthoobenzoate) aux récepteurs GABA de vertébrés et d'insectes (D'après Hainzl et al., 1998). 21

Tableau 6 : Répartition des lots de rats pour le sacrifice. 26

Tableau 7 : Concentrations en hormones thyroïdiennes libres (pg/mL) et totales (ng/mL), fractions libres et rapports des concentrations, dans le lot traité au fipronil par voie orale (30 mg/kg d'aliment) pendant une période de 28 jours et dans le lot contrôle. 37

Tableau 8 : Valeurs des constantes moyennes estimées à partir de la modélisation de l'évolution des concentrations plasmatiques de fipronil au cours du temps, sur la base d'un système tricompartmental, après l'injection d'un bolus IV de fipronil (1mg/kg) à t0. 44

Tableau 9 : Valeurs des principaux paramètres pharmacocinétiques du fipronil chez le mouton estimés à partir de la modélisation de l'évolution des concentrations plasmatiques de fipronil au cours du temps, sur la base d'un système tricompartmental, après l'injection d'un bolus IV de fipronil (1mg/kg) à t0. 44

Tableau 10 : Valeurs des constantes moyennes estimées à partir de la modélisation de l'évolution des concentrations plasmatiques de fipronil sulfone au cours du temps, sur la base d'un modèle extravasculaire bicompartimental, avec un délai entre l'injection IV de fipronil (1mg/kg à t0) et l'apparition de fipronil sulfone. 45

Tableau 11 : Valeurs des principaux paramètres pharmacocinétiques du fipronil sulfone chez le mouton obtenues par la modélisation de l'évolution des concentrations plasmatiques de fipronil sulfone au cours du temps, sur la base d'un modèle extravasculaire bicompartimental, avec un délai entre l'injection IV de fipronil (1mg/kg à t0) et l'apparition de fipronil sulfone. 46

Introduction

Le fipronil est un pesticide de la famille des phénylpyrazoles utilisé dans le monde entier et dans de nombreux domaines. Il est notamment largement utilisé dans le domaine agricole, en tant que produit phytosanitaire. En France, ce produit fait l'objet d'une interdiction pour les usages phytosanitaires en agriculture. Cette interdiction repose sur la suspicion d'une éventuelle toxicité des formules telles que le *Régent*® (BASF, USA) pour les abeilles. Le fipronil est également utilisé en grande quantité comme insecticide dans des domaines professionnels tels que le domaine vétérinaire et celui de la désinsectisation de locaux, mais également dans le domaine ménager. Ainsi cette molécule peut être présente dans des écosystèmes très variés et très étendus ce qui, allié à sa grande stabilité, en fait un polluant environnemental potentiel.

Parmi les polluants environnementaux, il existe un ensemble de molécules classées sous l'appellation de « perturbateurs endocriniens ». Les perturbateurs endocriniens sont des substances qui interfèrent avec les fonctions du système hormonal, risquant d'influer négativement sur la physiologie, les processus de synthèse, de sécrétion, de transport, d'action et d'élimination des hormones. Ainsi, ils influencent la régulation hormonale du développement, de la croissance, de la reproduction et du comportement.

Ces dernières années, l'intérêt de l'opinion publique pour les perturbateurs endocriniens n'a cessé d'augmenter, les substances toxiques qui subsistent résiduellement dans l'environnement et leurs effets potentiels sur la nature et sur la santé humaine sont une grande préoccupation actuelle, en permanente évolution sur le plan scientifique mais également du point de vue réglementaire.

De ce fait, tout un contexte politique entoure ce sujet d'actualité. En effet dès décembre 1999, la Communauté Européenne a engagé une communication auprès du Conseil Européen et auprès du Parlement Européen sur l'établissement d'une stratégie communautaire pour les perturbateurs endocriniens. Depuis 2001, un bureau de travail européen sur les perturbateurs endocriniens centralise toutes les données sur ce sujet. Plus récemment, les pressions sociétales pour avoir une meilleure connaissance des risques dus aux molécules chimiques et en particulier de celles qui persistent dans l'environnement ont abouti à la présentation par la Communauté Européenne du projet de loi R.E.A.CH (Registration, Evaluation, Authorisation of CHemicals) en octobre 2003. Ce projet concerne 30000 molécules chimiques présentes sur le marché européen et vise entre autre au regroupement des informations sur ces molécules et

à l'uniformisation des démarches permettant d'évaluer leur toxicité tout en préservant le dynamisme des marchés industriels européens de la chimie. Depuis, la pression des « lobbys » industriels a mené à un allègement de ce projet de loi qui a été adopté en novembre 2005 par le parlement européen et est actuellement en discussion au Conseil des ministres. Il devrait entrer en vigueur en 2007.

Le fipronil fait partie des perturbateurs endocriniens. Des études toxicologiques ont montré qu'il est inducteur de cancérogenèse thyroïdienne chez le rat, mais pour des doses très élevées, supérieures à celles auxquelles la molécule est normalement utilisée. Il est nécessaire d'étudier les effets du fipronil sur les espèces vertébrées qui ne sont pas des cibles prévues dans son usage thérapeutique (amphibiens, reptiles, oiseaux, poissons et mammifères) afin de mieux pouvoir évaluer les conséquences toxicologiques de l'utilisation de cette molécule, en particulier chez l'homme (Tingle et al., 2003) surtout lors de confrontation de manière répétée et chronique à de petites doses de ce produit. L'évaluation des conséquences d'une telle exposition sur la fonction thyroïdienne est très importante. Jusqu'à présent le modèle animal employé pour mener ces études toxicologiques était le rat, modèle traditionnel en matière d'expérimentation et recommandé par la réglementation. Cependant, il existe des différences importantes de physiologie thyroïdienne entre le rat et l'homme. Ces différences sont gênantes car il est difficile d'extrapoler à l'homme des résultats toxicologiques qui sont obtenus chez le rat. Ainsi, notre projet s'inscrit dans le cadre du développement d'un modèle d'étude pertinent par rapport à l'homme, pour l'étude de la toxicité des xénobiotiques sur les fonctions thyroïdiennes.

Dans ce cadre, notre étude a pour objectif de comparer le modèle ovin par rapport au modèle rat, et d'évaluer les paramètres pharmacocinétiques du fipronil chez le mouton afin de déterminer un schéma posologique capable de mimer chez les ovins l'exposition au fipronil qui a été associée chez le rat à une perturbation de la fonction thyroïdienne.

Première partie : Partie bibliographique

I. L'axe hypothalamo-hypophysaire thyroïdien

I.1. Eléments de physiologie thyroïdienne

I.1.1. La stimulation de la fonction thyroïdienne

La glande thyroïde reçoit des stimulations qui proviennent des principaux centres régulateurs endocriniens de l'organisme : l'hypothalamus et l'hypophyse. L'hypothalamus sécrète la TRH (Thyrotropin Releasing Hormone) qui en agissant sur l'antéhypophyse induit la sécrétion de TSH (Thyroid Stimulating Hormone). Les cellules folliculaires de la glande thyroïde possèdent des récepteurs à la TSH qui lorsqu'ils sont activés entraînent l'activation d'une adénylate cyclase et une augmentation du taux d'AMPc intracellulaire. Ceci a alors pour conséquence d'activer d'une part la libération des hormones thyroïdiennes et d'autre part la synthèse de thyroglobulines, de thyroperoxydases et de protéines du symport Na/I.

I.1.2. La synthèse et la sécrétion des hormones thyroïdiennes

Les iodures du sang sont captés par les cellules folliculaires de la thyroïde grâce à un mécanisme de transport actif qui met en jeu un cotransporteur Na⁺/I⁻. Ce cotransporteur fonctionne grâce à un gradient de Na⁺ entretenu par une pompe Na⁺/K⁺/ATPase. En outre, l'activité de ce transporteur est accrue lors de stimulation persistante par la TSH. La capture des iodures serait l'étape limitante de la synthèse des hormones thyroïdiennes iodées. Après leur capture, les iodures sont oxydés et fixés à des molécules organiques (Pour revue : Kaneko, 1997).

Les iodothyronines qui forment les hormones thyroïdiennes sont synthétisées à partir de l'iodation des résidus tyrosyls de la thyroglobuline via la thyroperoxydase (en présence d'iodures, de NADPH, et d'H₂O₂). Ensuite, ces résidus iodés sont couplés entre eux au sein de la thyroglobuline. La thyroglobuline est ensuite captée par endocytose par les cellules folliculaires afin d'être hydrolysée par protéolyse lysosomiale. S'en suit une libération des hormones T3 (triiodothyronine) et T4 (tétraiodothyronine ou thyroxine) dans le torrent circulatoire, ainsi qu'un recyclage intracellulaire de MIT (monoiodotyrosine) et de DIT (diiodotyrosine) (Pour revue : Larsen et al., 1998).

I.1.3. L'utilisation des hormones thyroïdiennes

Dans la circulation sanguine, la majorité des hormones thyroïdiennes sont liées à des transporteurs et sont à l'équilibre avec leurs formes libres. Seules les formes libres peuvent être captées en vue d'une utilisation tissulaire. De plus, à la surface de certaines cellules cibles et des cellules hépatiques se situent des désiodases membranaires qui vont agir sur la T4 (thyroxine). Cette dernière va subir une désiodation par une thyroxine-5'-désiodase et être transformée en T3 (triiodothyronine) qui est la forme active des hormones thyroïdiennes. Ainsi la T4 est parfois considérée comme une prohormone de la T3 (Pour revue : Kaneko, 1997).

Les hormones thyroïdiennes vont agir sur l'organisme en augmentant le métabolisme de base. Elles participent à la régulation de la croissance, de la thermogénèse, des fonctions cardiovasculaires et respiratoires, de l'alimentation et de la digestion, de la tonicité musculaire, du développement du système nerveux... (Pour revue : Larsen et al., 1998).

I.1.4. Le catabolisme et l'élimination des hormones thyroïdiennes

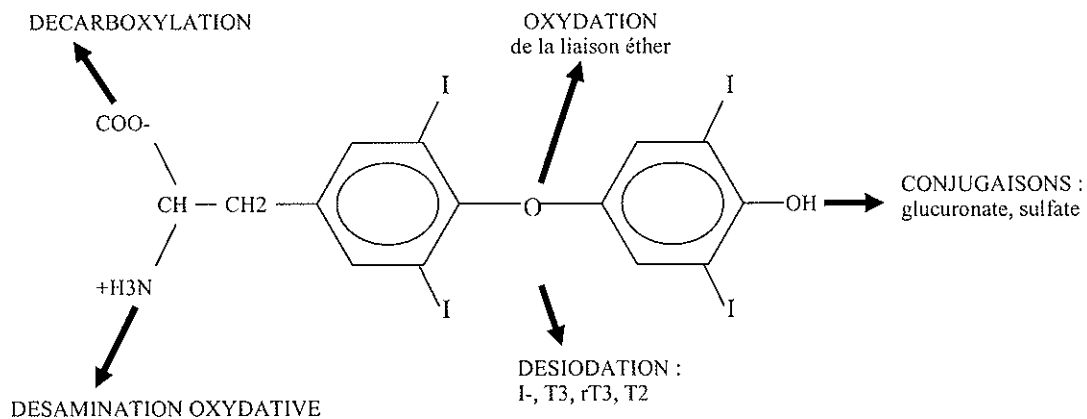


Figure 1 : Les différentes voies du catabolisme des hormones thyroïdiennes.

Le catabolisme des hormones thyroïdiennes a lieu principalement dans le foie et également un peu dans le rein. Il se déroule en deux phases : la phase 1 consiste à dénaturer l'hormone et à la préparer pour la phase 2 qui se traduit par la conjugaison des métabolites primaires à un groupement qui facilitera leur élimination biliaire ou urinaire.

Les réactions de phase 1 sont catalysées par un ensemble d'enzymes du cytochrome P450 monooxygénase. Le cytochrome P450 est lié aux membranes cellulaires du réticulum endoplasmique lisse et est formé d'enzymes possédant des complexes porphyrine renfermant

chacun un atome de Fer. Il catalyse des réactions d'oxydation dépendantes de NADPH et d'oxygène qui vont se traduire pour les hormones thyroïdiennes par le clivage de la liaison éther entre les deux cycles aromatiques. Ce clivage conduit à la libération de DIT (diiodothyronine) ou de MIT (monoiodothyronine). Chez l'homme, il existe trois familles majeures de cytochromes P450 : CYP1, CYP2 et CYP3. Les cytochromes P450 sont peu spécifiques et peuvent prendre en charge un grand nombre de molécules différentes. L'activité des cytochromes est inductible par certaines substances organiques ou par des xénobiotiques et le catabolisme des molécules prises en charge peut ainsi en être accru ou en être diminué.

La deuxième phase du catabolisme des hormones thyroïdiennes consiste en des réactions de conjugaison qui accolent aux noyau phénol des hormones un groupement glucuronate (ou plus rarement sulfate) très hydrosoluble qui facilite l'élimination par la bile ou par l'urine. Cet accolement est formé par des enzymes UDP-glucuronyltransférases (UGT) et sulfotransférases qui créent des liaisons osidiques avec l'UDPglucuronate et le sulfate. Les hormones conjuguées sont alors excrétées par voie biliaire et éliminées par voie fécale. Cependant, une très petite fraction de ces catabolites hormonaux est déconjuguée dans le tube digestif et subit un cycle entéro-hépatique. Lors de la réabsorption intestinale et du passage dans le compartiment vasculaire, une partie des catabolites est éliminée par voie rénale.

Au total, 16 UGT différentes sont connues chez le rat et 19 chez l'homme. Ces enzymes sont inductibles comme les cytochromes, par des molécules endogènes ou exogènes et leur activité est variable. Au moins 3 isoenzymes d'UGT seraient impliquées dans la conjugaison des hormones thyroïdiennes chez le rat. Une étude conclut que les types UGT1 et UGT2 agiraient préférentiellement sur la T4 et sur la rT3. Le type UGT3 agirait quant à lui sur la conjugaison de la T3 (Visser et al., 1993).

Enfin, il existe d'autres voies métaboliques du catabolisme des hormones thyroïdiennes :

- La désamination oxydative puis la décarboxylation des acides α -cétoniques forme les acides tétra- et tri-iodoacétiques qui après désiodation donnent l'acide thyroacétique.
- La décarboxylation des hormones donne des amines primaires (tétra- et tri-iodothyronamines) qui peuvent aussi être désiodées ce qui permet à l'organisme de recycler l'iode.

Les principales réactions intervenant dans le catabolisme peuvent avoir lieu dans un ordre différent si bien qu'une grande variété de catabolites peut être produite (Figure 1).

I.1.5. La régulation de la fonction thyroïdienne

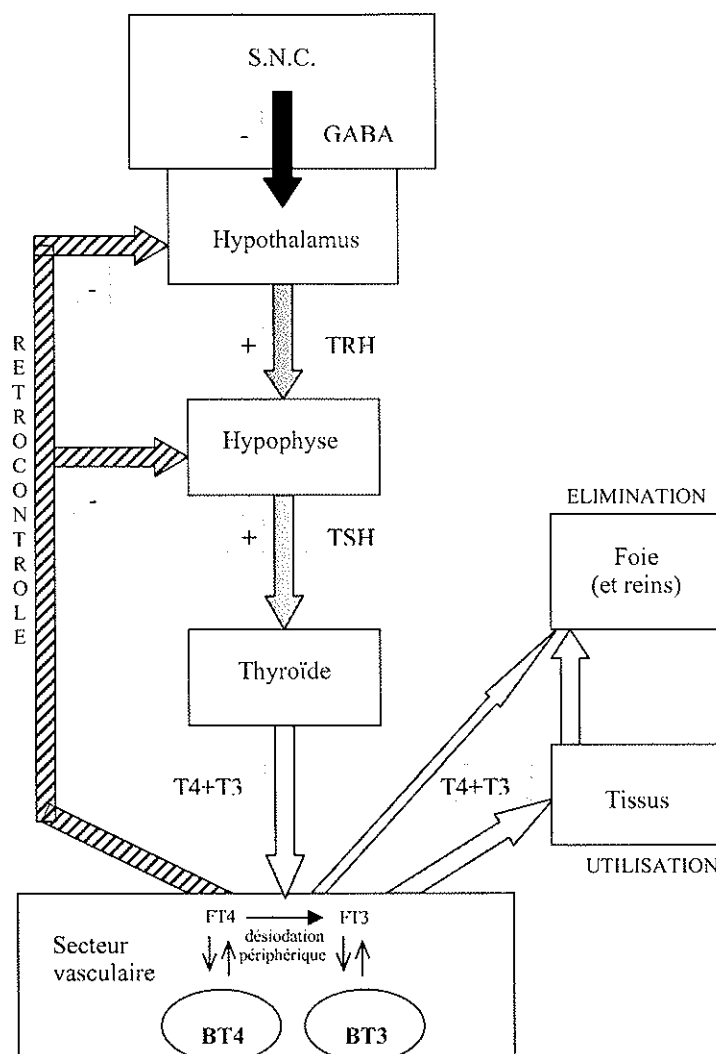


Figure 2 : Les voies de régulation de la fonction thyroïdienne.

L'augmentation des concentrations en T3 et T4 libres est suivie d'une augmentation du rétrocontrôle négatif sur l'hypothalamus et sur l'hypophyse qui se traduit par une diminution de leurs sécrétions respectives de TRH et de TSH (Figure 2). De nombreux neuromédiateurs agissent sur les neurones à TRH et en particulier l'acide gamma-amino-butyrique encore appelé « gaba ». En effet, les neurones à TRH hypophysiotropes du noyau paraventriculaire font l'objet d'une innervation GABAergique centrale (Feteke et al., 2002). Chez le rat, l'administration intra-crânienne, dans le troisième ventricule, d'acide gamma-amino-butyrique a une action inhibitrice sur la sécrétion de TSH via une action centrale probable (Jordan et al., 1983). Enfin, certaines molécules endogènes influencent la fonction thyroïdienne comme les catécholamines, les cytokines et la somatostatine hypothalamique.

I.2. Variations interspécifiques de physiologie thyroïdienne

Il est important de connaître les variations interspécifiques de physiologie thyroïdienne pour pouvoir déterminer quelle espèce est la mieux appropriée pour servir de modèle animal dans la réalisation d'une évaluation toxicologique pour l'homme. En effet, si on veut pouvoir extrapoler à l'homme les résultats d'une expérience, il faut que le modèle animal d'étude ait une physiologie la plus proche possible de celle de l'homme.

Les concentrations basales et les fractions libres en thyroxine varient peu entre l'homme, le mouton et le rat. Les concentrations de thyroxine totale semblent toutefois légèrement inférieures chez le mouton et le rat (Tableau 1).

		Sexe	Protéines totales (g/L)	Iode lié aux protéines (µg/L)	Fraction libre de T4 (%)	TT4 (µg/L)	FT4 (ng/L)
Homme	Normal	M	74	70	0,040	62	25
	Déficient en TBG	F	76	18	0,126	11	14
Mouton		F	62	30	0,047	36,5	17,5
Rat		M	66	39	0,064	37,7	24

Tableau 1 : Variation des paramètres de la fonction thyroïdienne chez l'homme, le rat, et le mouton (D'après Refetoff et al., 1970). Les valeurs de l'étude étant homogènes, les valeurs présentées sont les moyennes des valeurs de l'étude.

Malgré les similarités des valeurs de base, il existe des différences majeures entre ces trois espèces en ce qui concerne la nature des protéines plasmatiques en charge du transport plasmatique des hormones thyroïdiennes (Tableau 2, 3 et 4). Ces protéines de transport sont:

- La TBG (Thyroxin Binding Globulin) est sécrétée par le foie. Elle est présente de manière inconstante chez le rat, qui bien que possédant un gène de la TBG ne le transcrit qu'en période post-natale (jusqu'à 8 semaines) et en période de sénescence (à partir de 7 mois) (Savu et al., 1991). Durant la période où le rat ne synthétise pas de TBG, le temps de demi-vie de la T4 chez le rat est de 12 à 24h ce qui est très court alors que chez l'homme qui possède une TBG, la dégradation métabolique des hormones thyroïdiennes est plus lente et le temps de demi-vie de la T4 totale varie de 5 à 9 jours (Pour revue : Larsen et al., 1998). L'homme et le mouton possèdent la TBG. Cette protéine possède une constante d'affinité très élevée pour T4

et un peu plus faible pour T3. Les TBG de l'homme et du mouton ont des propriétés physico-chimiques communes : la capacité de lier la T4, la non-inhibition de la liaison par un tampon de barbituriques, une faible capacité de liaison à la thyroxine, une mobilité plus lente que l'albumine lors d'électrophorèse sur gel d'agarose qui leur vaut le nom de « thyroxin binding postalbumins » (Larsson et al., 1985). En outre, La TBG de l'homme est hautement spécifique et transporte les trois-quarts de la thyroxine alors que la TBG du mouton n'en transporte que la moitié. L'expression de la TBG est régulée par deux voies de contrôle, l'une est thyroïdienne et l'autre est hypophysaire (Vranckx et al., 1994).

- La transthyrétine (TTR) ou TBPA (Thyroxin Binding Prealbumin) est présente chez l'homme, le mouton et le rat. Elle est également synthétisée par le foie. Elle possède une capacité de fixation plus grande que celle de la TBG, cependant ses constantes d'affinité vis-à-vis de T4 et T3 sont plus faibles. L'expression de la TTR est régulée principalement par une voie de contrôle hypophysaire et est très peu régulée par la thyroïde (Vranckx et al., 1994).

- L'albumine est le principal transporteur des hormones thyroïdiennes chez les espèces où la TBG est absente. De plus chez ces espèces elle semble avoir une affinité augmentée pour les hormones thyroïdiennes. En effet, chez le rat, dont les hormones thyroïdiennes sont transportées par l'albumine, la fraction libre de T4 est identique à celle des autres espèces ce qui pourrait être en faveur d'une affinité augmentée de l'albumine pour les hormones thyroïdiennes (Refetoff et al., 1970). Quant aux autres espèces, le rôle de l'albumine y est variable : elle possède en effet une capacité de fixation très élevée mais son affinité pour les hormones thyroïdiennes est très faible.

- Les lipoprotéines ne concernent qu'une très petite fraction des hormones transportées

	Répartition de la thyroxine en %			
	Thyroxine liée aux protéines de transport			Thyroxine non liée
	TBG	TTR	Albumine	
Homme	73,3	18,9	7,8	0,037
Ovin	53,1	35,6	11,3	0,056
Rat	-	85,1	14,8	0,066

Tableau 2 : Variations de la nature des protéines de transport de la thyroxine chez l'homme, le rat et le mouton (D'après Sutherland et al., 1975).

	Constantes de dissociation Kd (nmole/L) pour la thyroxine (T4)		
	TBG	TTR	Albumine
Homme	0,105	6,25	2780
Ovin	0,112	7,14	2860
Rat	-	2,78	1540

Tableau 3 : Affinité variable des protéines de transport pour la thyroxine chez l'homme, le rat et le mouton (D'après Sutherland et al., 1975).

	Capacité de liaison Bmax (nmole/L) de la thyroxine (T4)		
	TBG	TTR	Albumine (x10 ⁶)
Homme	266,6	3229,6	51,3
Ovin	160	4494	35,2
Rat	-	3968,2	30,2

Tableau 4 : Capacité variable des protéines de transport de la thyroxine chez l'homme, le rat et le mouton (D'après Sutherland et al., 1975).

II. Les perturbateurs thyroïdiens

II.1. Les mécanismes d'action potentiels des perturbateurs thyroïdiens

Les perturbateurs endocriniens sont des substances exogènes, présentes dans l'environnement, qui entraînent des effets néfastes pour la santé chez un organisme ou chez sa progéniture, en agissant au niveau des fonctions endocrines.

Il existe de nombreux mécanismes d'action des perturbateurs thyroïdiens : Ils peuvent agir sur l'inhibition de la capture de l'iode par la glande thyroïde, inhiber la synthèse des hormones thyroïdiennes, être pris en charge par les protéines de transport au détriment de la thyroxine, altérer la métabolisation et l'élimination des hormones thyroïdiennes par le foie. De plus ils peuvent agir comme des compétiteurs des hormones thyroïdiennes au niveau de leur récepteurs cellulaires, agir comme agoniste ou antagoniste de ces hormones, ou encore interagir avec certains cofacteurs des récepteurs aux hormones thyroïdiennes (Pour revue : Brown, 2003).

II.2. Les principales molécules qui perturbent la fonction thyroïdienne et leurs mécanismes d'action

Les molécules qui perturbent la fonction thyroïdienne peuvent être des médicaments ou, des molécules chimiques qui persistent dans l'environnement. Ce sont ces dernières qui nous intéressent. Il existe de nombreuses molécules perturbatrices de la glande thyroïde, seules les principales sont citées ici (Pour revue : Thomas et al., 1999) :

- Le dioxyde de chlore qui est un désinfectant pour piscine provoquerait une diminution des concentrations plasmatiques de T4 en inhibant le symport du sodium et de l'iode, et donc la capture d'iode par la glande thyroïde (Zoeller, 2003).

- Des herbicides comme les phénylcarbamides chlorés, les bicarbamates, les uraciles substitués, les pyridazinones, et les éthers biphényls induisent des changements dans l'activité de la glande thyroïdienne. Le nitrophène, un nitrophénol halogéné réduit la taille et la densité colloïdale de la glande thyroïde. Les triazines ont un effet supprimeur sur la fonction thyroïdienne. L'aminothiazole a une action directe sur la thyroïde car il inhibe la synthèse de T4 et il accélère sa désiodation. L'herbicide 2,4-D provoque une diminution des concentrations plasmatiques de protéines liées à l'iode. Le thiazopyr provoque une élévation des taux de TSH entraînant des hypertrophies, des hyperplasies et des anaplasies des cellules folliculaires. Les herbicides peuvent également être à l'origine de tumeurs thyroïdiennes. Peu d'herbicides ont une action mutagène (comme l'aceto-chlor) et aucun n'agit que par mutagenèse. En effet, tous ont en commun la capacité d'induire des cancers en déséquilibrant la régulation de la fonction thyroïdienne et en augmentant les concentrations plasmatiques de TSH. Les modes d'action qui aboutissent à l'élévation de TSH sont variables. Il existe des modes d'action intra-thyroïdiens et d'autres qui sont extra-thyroïdiens. Les herbicides qui agissent au niveau de la thyroïde (comme l'ami-trole, les dithiocarbamates) agissent en altérant le fonctionnement de la thyroperoxydase. Certains herbicides agissent en périphérie de la thyroïde (comme l'aceto-chlor) notamment à travers une action sur le métabolisme hépatique et induisent l'activation des enzymes hépatiques ce qui a pour conséquence une augmentation de l'élimination des hormones thyroïdiennes et partant une diminution du rétrocontrôle des hormones thyroïdiennes sur l'axe hypothalamo-hypophysaire et une stimulation de la libération de TSH, créant ainsi un emballement de la dynamique cellulaire de la thyroïde (Pour revue : Hurley, 1998).

- Des fongicides de la famille des EBDC (éthylène bis dithiocarbamates) comme le nabame, le zinèbe, et le ziram sont capables d'inhiber la capture d'iode par la glande thyroïde. Le corps humain les métabolise en éthylène thiourée qui est une substance carcinogène pour la thyroïde (Pour revue: Brown, 2003). L'éthylène thiourée et la mancozeb agiraient en altérant le fonctionnement de la thyroperoxydase. Le fenbuconazole agirait sur le métabolisme hépatique (Pour revue : Hurley, 1998).

- Des polluants industriels semblent aussi perturber la glande thyroïde. Les PCB (biphényles polychlorés) sont largement utilisés dans l'industrie électrique, dans l'industrie chimique de l'huile, des peintures, des papiers, des adhésifs, des mastics et autres plastiques. Les PBDE (diphényles éthers polybromés) sont utilisés comme retardateurs de flamme. La toxicité aiguë des PCB et des PBDE est faible, mais compte tenu de leur caractère cumulatif, en cas d'administration prolongée ils peuvent présenter un danger. Ces molécules sont stables dans l'environnement et la totalité des écosystèmes a été contaminée (INRA, www.afssa.fr/ftp/afssa/basedoc/Rapportfipro.pdf, mars 2005). Les mécanismes d'action des PCB sont bien décrits et les expériences menées concluent qu'ils agissent premièrement en diminuant la capacité de la TSH à augmenter les taux circulants de T4, et deuxièmement en altérant le métabolisme des hormones thyroïdiennes via un accroissement du catabolisme hépatique et de l'élimination biliaire des hormones. En effet, les PCB augmenteraient l'expression et l'activité de la glucuronyltransférase (Kato et al., 2004) impliquée dans la glucuronoconjugaison de la T4 (Visser et al., 1993). Ainsi la clairance hépatique de la T4 est augmentée et son temps de demi-vie plasmatique est diminué. De plus, certains PCB se lieraient avec une bonne affinité aux protéines de transport des hormones thyroïdiennes dans le sang, déplaçant ainsi des T4 liées vers des formes de T4 libres alors exposées à une plus grande utilisation par les cellules et à une élimination accrue par le foie (Pour revue : Zoeller et al., 2002). L'augmentation du métabolisme des hormones thyroïdiennes entraînerait une diminution de la concentration plasmatique de T4 qui résulterait en une augmentation de la sécrétion de TRH et de TSH du fait de la diminution du rétrocontrôle négatif exercé par la T4 au niveau hypothalamique et hypophysaire. Cependant, dans certains modèles, on observe que des mélanges de PCB induisent une diminution des concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes, sans modification concomitante des concentrations plasmatiques de TSH (Goldey et al., 1995).

Les dibenzofuranes et les dibenzodioxines polyhalogénés dont la 2, 3, 7, 8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) sont des déchets industriels fréquents. Ils

augmenteraient l'activité des UDPGT hépatiques et par conséquent diminueraient les concentrations plasmatiques de T4 chez le rat.

De nombreux polyhydroxyphénols (dont le résorcinol, le catéchol, l'hydroquinone, le phloroglucinol, et l'orcinol) sont des inhibiteurs de la thyroperoxydase.

Le cyanure présent dans l'industrie est connu pour provoquer des hypothyroïdies et pour être goitrigène.

II.3. Les conséquences sur l'organisme des perturbations thyroïdiennes

II.3.1. L'apparition de troubles fonctionnels

Une perturbation de la fonction thyroïdienne a des répercussions sur tout l'organisme. Les conséquences sont d'autant plus graves que les troubles apparaissent pendant la gestation ou pendant la croissance. En effet, pendant ces phases de développement, l'apparition d'un hypothyroïdisme aura pour conséquence des retards du développement staturo-pondéral et de l'appareil psychomoteur. Les séquelles cérébrales sont lourdes et irréversibles et conduisent à des retards mentaux appelés « crétinisme ». Des troubles morphologiques (macroglossie,...) et fonctionnels secondaires peuvent également apparaître : gêne respiratoire, gêne à la déglutition, bradycardie, ... (Pour revue : Larsen et al., 1998).

Chez l'adulte des syndromes d'hypothyroïdisme et d'hyperthyroïdisme peuvent également se développer avec des degrés de gravité variable. En effet, certains hyperthyroïdismes peuvent être très graves car difficiles à contrôler comme c'est le cas dans la maladie de Grave chez l'homme où des anticorps circulants qui possèdent un degré important d'analogie structurale avec la TSH se fixent sur les récepteurs à la TSH de la glande thyroïde, et entraînent l'activation permanente de la glande thyroïde (Pour revue : McClain, 1995).

II.3.2. La carcinogénèse thyroïdienne

L'apparition d'hyperplasies thyroïdiennes et de cancers peut être causée par une multitude de facteurs différents, certains déterminants et d'autres seulement favorisants, dont la variabilité inter-espèces est très grande. Chez l'homme, les cancers sont le plus souvent des cancers des cellules folliculaires alors que chez les rongeurs ils peuvent aussi être des cancers des cellules à calcitonine. De plus, la nature histologique des différentes tumeurs est variable entre les espèces : chez l'homme on distingue clairement des tumeurs de nature folliculaire et des tumeurs de nature papillaire. Chez l'animal, ces deux types sont moins différenciés bien que les tumeurs des rongeurs puissent être rapprochées des tumeurs folliculaires (Pour revue : Williams, 1995).

Il existe deux principaux mécanismes déterminants pour la cancérisation de la thyroïde. Le premier mécanisme consiste en une mutagenèse des cellules thyroïdiennes due à l'action d'agents mutagènes chimiques ou bien radiologiques. Cependant, ce mécanisme même s'il permet le développement de tumeurs papillaires chez l'homme, ne suffirait pas seul à produire des tumeurs folliculaires chez l'homme ou chez l'animal, pour lesquelles une élévation de la sécrétion de TSH serait nécessaire. En effet, le second mécanisme de cancérisation est une hyperstimulation de la thyroïde par une sécrétion hypophysaire accrue de TSH (Pour revue : Williams, 1995). Cette augmentation de la TSH peut être causée par une altération de la synthèse ou du métabolisme des hormones thyroïdiennes qui conduit à une diminution des concentrations plasmatiques d'hormones thyroïdiennes. La diminution des concentrations plasmatiques d'hormones thyroïdiennes provoque une augmentation de la sécrétion de TSH par le biais du rétrocontrôle qu'elles exercent sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. La stimulation de la croissance thyroïdienne par la TSH augmente le taux de division cellulaire. La multiplication cellulaire augmente le risque qu'un gène suppresseur de tumeur perde son caractère hétérozygote et donc qu'une mutation sur un allèle lui enlève sa fonction. En outre, contrairement aux processus d'oncogenèse classique, la croissance des tumeurs thyroïdiennes ne deviendrait pas à terme indépendante de la stimulation de TSH, mais au contraire y resterait inféodée (Pour revue : Williams, 1995).

Il existe des mécanismes compensateurs de l'hypersecretion de TSH qui se développent au niveau de la thyroïde. Par exemple, une augmentation de TSH consécutive à l'induction des UDP-glucuronosyltransférases hépatiques (par le phénobarbital ou par le prégnenolone-16-alpha-carbonitrile par exemple) conduit à l'expression de TGF β 1 (Transforming Growth Factor) par la glande thyroïde. La TGF β 1 est une protéine pro-apoptotique et antiproliférative qui régulerait le développement de l'hyperplasie thyroïdienne induite par l'hypersecretion de TSH (Kolaja et al., 1998). D'autres récepteurs aux protéines kinases comme le récepteur à l'HGF (Hepatocytes Growth Factor) joueraient aussi un rôle dans la régulation de la croissance thyroïdienne (Pour revue : Williams, 1995). De plus, il existe une auto-régulation des récepteurs à la TSH qui modulent leur réponse par désensibilisation et internalisation (en changeant de conformation après s'être liés à la TSH). Le récepteur produit de l'AMP cyclique grâce à sa fonction adénylcyclase, or cette fonction est elle-même autorégulée par des iodolipides qui atténuent la formation d'AMP cyclique (Pour revue: McClain, 1995).

III. Le fipronil

III.1. Structure

Le fipronil est une molécule du groupe des phényl-pyrazoles. Son nom chimique est le 5-amino-3-cyano-1-(2,6-dichloro-4-trifluorométhylphényl)-4-trifluorométhylsulfinylpyrazole (Figure 3) :

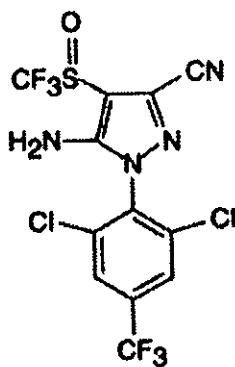


Figure 3 : Structure chimique du fipronil.

III.2. Activité

Le fipronil a principalement pour cible les récepteurs du GABA (Acide γ -amino-butérique) des invertébrés dont il bloque les canaux chlorures. Les récepteurs GABAergiques des invertébrés seraient relativement proches des récepteurs GABA A des mammifères (Rauh et al., 1990) qui possèderaient au moins trois sites de liaison spécifiques : le site de liaison du GABA, le site de liaison des benzodiazepines et le site de liaison de la picrotoxine. Les insecticides se lieraient près du site de liaison de la picrotoxine et inhiberaient l'ouverture du canal chlorure (Pour revue : Fonnum, 1999). Il existerait 5 sous-unités dans le récepteur dont la sous-unité bêta. Les mammifères possèdent une sous-unité β 3 hétéro-oligomère, alors que les insectes possèdent une sous-unité β 3 homo-oligomère, ces sous-unités β 3 auraient la même sensibilité et la même spécificité vis-à-vis du fipronil. La sélectivité du fipronil pour les récepteurs GABAergiques est variable et serait conditionnée par la nature des autres sous-unités du récepteur (Ratra et al., 2001). En outre, le fipronil aurait également pour cible des récepteurs au glutamate qui commandent l'ouverture de canaux chlorures, et qui ne sont présents que chez les invertébrés. L'existence de ces récepteurs au glutamate permettrait également d'expliquer la grande différence de sensibilité au fipronil entre les insectes et les mammifères. La sélectivité des insectes au fipronil est 700 à 1300 fois supérieure à celle des rats (Hainzl et al., 1998).

III.3. Le fipronil et ses mécanismes d'action sur la fonction thyroïdienne

Le fipronil semble agir sur le métabolisme hépatique et induire l'activation des enzymes hépatiques ce qui aurait pour conséquence une augmentation de l'élimination des hormones thyroïdiennes (Hurley, 1998), les concentrations plasmatiques d'hormones thyroïdiennes diminueraient et conséquemment, la sécrétion de TSH augmenterait. En outre, dans le cadre de sa fonction d'insecticide, le fipronil a pour cible les récepteurs GABA du système nerveux central. S'il est hautement spécifique des récepteurs GABA des invertébrés, il a une affinité réduite pour les récepteurs GABA des mammifères. Il pourrait se fixer sur les récepteurs GABA de mammifères et avoir une action centrale sur la thyroïde. En effet, les neurones à TRH font l'objet d'une innervation inhibitrice GABAergique centrale (Feteke et al., 2002). Enfin, la sélectivité des métabolites du fipronil pour les récepteurs GABAergiques diminue par rapport à la sélectivité du fipronil, que les métabolites soient endogènes comme le fipronil sulfone ou exogènes comme le désulfinyl fipronil, produit de la photodégradation (Tableau 5). Les rapports de sélectivité, pour les vertébrés par rapport aux insectes, sont de 158 pour le fipronil, de 31 pour le désulfinyl fipronil, de 19 pour le fipronil sulfone, et de 4 pour l' α -endosulfane (Hainzl et al., 1998). Bien que la sélectivité diminue considérablement pour les dérivés du fipronil, elle reste néanmoins supérieure à celle de l' α -endosulfane, qui appartient à la première génération d'insecticides ayant pour cible le récepteur GABA.

	Concentration inhibitrice de 50% de la fixation de [³ H]EBOB aux récepteurs GABA, IC ₅₀ (nmole/L)			
	Dérivés du fipronil			Polychlorocycloalcane
	Fipronil	Fipronil sulfone	Désulfinyl fipronil	α -endosulfane
Homme	942	155	64	11
Poule	1391	134	94	17
Saumon	832	174	254	33
Mouche	6,3	11,9	5,4	7
Drosophile	7,7	6,0	2,8	3,0

Tableau 5 : Sélectivité des dérivés du fipronil et d'un polychlorocycloalcane, comme inhibiteurs de la fixation in vitro de [³H]EBOB (4-éthynyl-4-*n*-[2,3-³H₂]-propylbicycloortho-benzoate) aux récepteurs GABA de vertébrés et d'insectes (D'après Hainzl et al., 1998).

III.4. Métabolisme

Chez les mammifères, le catabolite principal du fipronil est le fipronil sulfone obtenu par oxydation du groupe thioéther (Figure 4). Le fipronil sulfone pourrait jouer un rôle important dans la toxicité du fipronil car son affinité pour le récepteur GABA des vertébrés est supérieure à celle du fipronil (Hainzl et al., 1998).

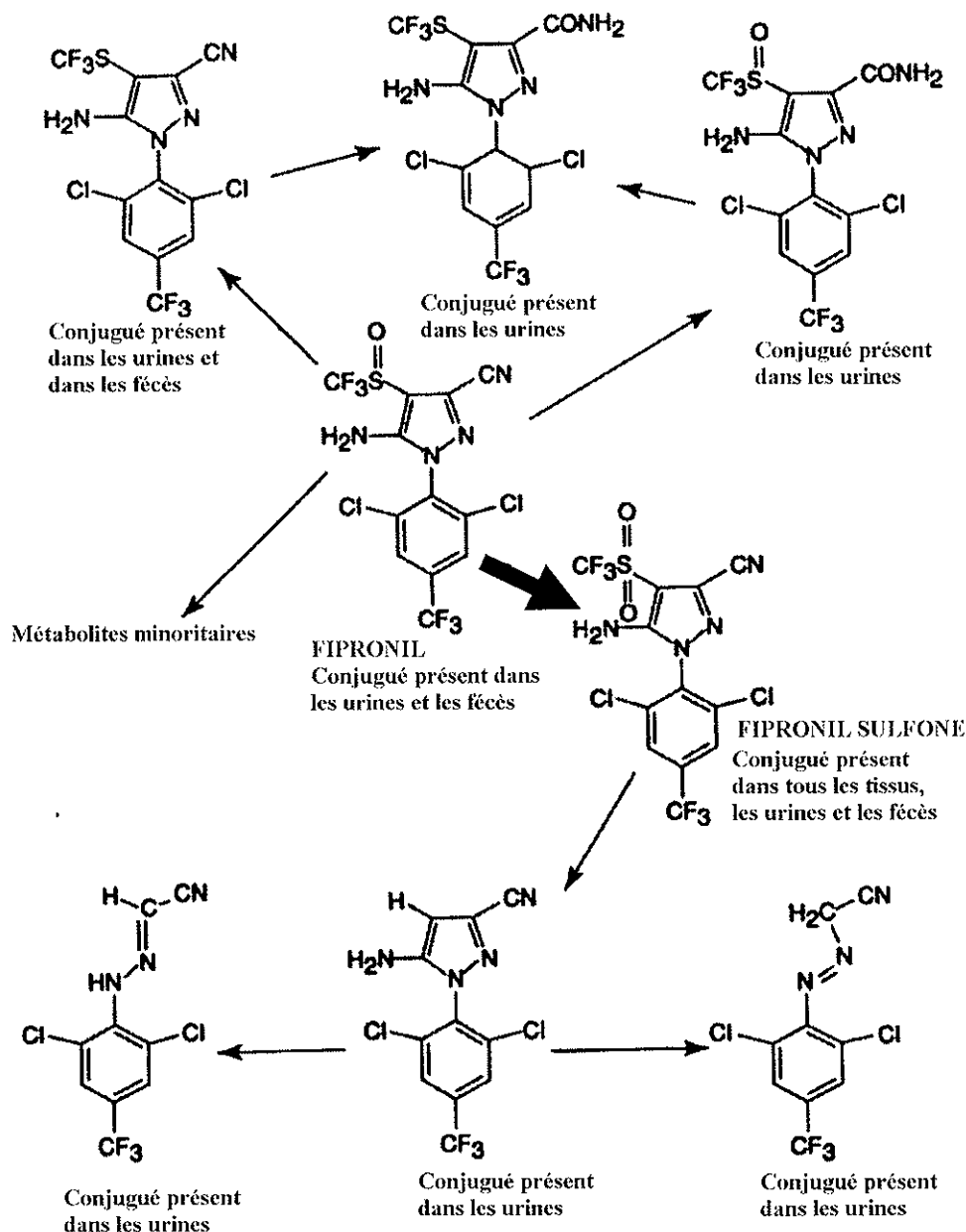


Figure 4 : Les voies de métabolisme du fipronil chez le rat (D'après AFSSA, www.afssa.fr/ftp/afssa/basedoc/Rapportfipro.pdf, mars 2005).

Le catabolisme du fipronil met en jeu majoritairement des cytochromes hépatiques et dans une moindre mesure des flavines-monooxygénases (Usmani et al., 2004). L'isoforme CYP3A4 du cytochrome P450, dont l'activité est dépendante de l'expression du cytochrome

b5, serait l'isoforme la plus active pour le catabolisme du fipronil dans le foie humain, suivie par le CYP2C19 qui est moins actif et moins spécifique du fipronil mais qui intervient tout de même dans les sulfoxydations de nombreux xénobiotiques possédant des structures thioéthers (Usmani et al., 2004). Ainsi, le fipronil pourrait interagir avec d'autres substrats du cytochrome P450 3A4 et provoquer une compétition entraînant une diminution du catabolisme et donc de l'élimination d'autres molécules comme cela a été montré pour le diazépam, le kétoconazole et la testostérone (Tang et al., 2004).

Le rat et l'homme ont un équipement enzymatique hépatique comparable, notamment en ce qui concerne les cytochromes. Les constantes d'affinité (K_m) pour le fipronil sont identiques chez les deux espèces mais la vitesse maximale d'élimination (V_{max}) est supérieure chez le rat. Ainsi, la clairance du fipronil serait supérieure chez le rat comparativement à l'homme (Tang et al., 2004).

IV. Présentation de la partie expérimentale

Les études concernant la toxicité du fipronil ont été menées chez le rat. Le rat est une espèce chez laquelle le fipronil entraînerait une perturbation de la fonction thyroïdienne, il interviendrait en induisant une augmentation de la clairance hépatique des hormones thyroïdiennes ce qui aurait pour conséquence une diminution de la concentration plasmatique de T4 (thyroxine). La T4 exerce un rétrocontrôle négatif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. Ce rétrocontrôle serait donc diminué chez un animal traité au fipronil et il en résulterait une augmentation de la sécrétion hypophysaire de TSH (Thyroid Stimulating Hormone). L'hypersécrétion de TSH ainsi induite serait un facteur favorisant la cancérisation de son organe cible, la thyroïde.

A la différence de l'homme, les rats ne possèdent pas de TBG (Thyroxin Binding Globulin), protéines de transport spécifiques des hormones de la thyroïde (T3 et T4). Cette différence de physiologie entre le rat et l'homme est mise en avant dans les études toxicologiques pour discuter des conséquences thyroïdiennes d'une exposition au fipronil.

L'étude de la toxicité du fipronil chez un modèle animal autre que le rat, et qui serait physiologiquement plus proche de l'homme, permettrait de mieux évaluer l'impact de cette molécule sur la fonction thyroïdienne humaine. Le modèle ovin peut être retenu car il a une physiologie thyroïdienne proche de celle de l'homme, notamment en ce qui concerne les protéines de transport des hormones thyroïdiennes.

Ce travail s'inscrit dans le cadre du développement et de la validation du modèle ovin comme outil pour l'étude des effets délétères du fipronil sur la fonction thyroïdienne. L'étude expérimentale a été réalisée dans le cadre de l'UMR 181- Physiopathologie et toxicologie expérimentales- INRA/ENVT.

L'objectif de ce travail est de développer et de valider un modèle animal permettant de comparer à exposition équivalente les effets du fipronil sur la fonction thyroïdienne du rat et du mouton. Pour valider le modèle, des pré-requis sont indispensables pour pouvoir affirmer que les différents effets éventuels chez le rat ou chez le mouton ne sont pas imputables à des variations interspécifiques de métabolisme du fipronil mais au contraire reflètent bien des perturbations de physiologie thyroïdienne. L'objectif de ce travail consiste à établir un schéma posologique chez le mouton qui permette de reproduire une exposition au fipronil comparable à celle obtenue via le schéma posologique appliqué aux rats et ayant induit des modifications de la sécrétion de TSH. Pour cela, la première étape est de déterminer l'exposition précise du rat au fipronil, selon les données de l'industrie, à l'état d'équilibre, lors de traitement ayant induit des modifications de la fonction thyroïdienne. La deuxième étape est d'établir chez le mouton un schéma posologique reproduisant le niveau d'exposition au fipronil obtenu chez le rat, dans les conditions où cette molécule induit une perturbation thyroïdienne. Pour ce faire, il est nécessaire de déterminer préalablement les paramètres pharmacocinétiques du fipronil chez le mouton.

Deuxième partie : Partie expérimentale

I. Détermination de l'exposition de rats au fipronil lors d'un traitement associé à des perturbations de la fonction thyroïdienne

I. 1. Matériels et méthodes

I.1.1. Animaux

Cette expérience est réalisée sur 36 rats femelles, de race Wistar, âgées de 6 mois et castrées depuis plus de 3 mois. Les rates sont réparties au hasard en 9 lots, chaque lot contenant 4 animaux. Les cages contenant chacune un lot sont placées dans des armoires à rongeurs. Le cycle lumineux est inversé: 12 heures d'obscurité (de 10 heures à 22 heures) suivies de 12 heures de clarté (de 22 heures à 10 heures). Dans les cages, les rats sont logés sur de la litière. Ils sont nourris avec une alimentation rat standard (*Harlan Teklad global diets, USA*) en poudre *ad libitum* à laquelle ils ont été habitués depuis au moins 1 semaine avant le début de l'expérience. De l'eau est à leur disposition *ad libitum*. Chaque animal est identifié par une lettre et un chiffre inscrits au marqueur indélébile sur la queue. La lettre identifie son lot (A, B, C, D, E, F, G, H, I) et le numéro l'identifie au sein même du lot (1, 2, 3, 4). Afin d'éviter les contaminations entre lots, les lots contrôles (G, H, I) sont toujours manipulés en premier.

I.1.2. Produit, préparation et administration

Pour cette étude, le fipronil employé est du *Fipronil Standard Grade* ((+/-)-5-amino-1-(2,6-dichloro-alpha, alpha-trifluoro-p-tolyl)-4-trifluoromethylsulfinylpyrazole-3-carbonitrile), Sigma France, référence n° 46451. Le fipronil se présente sous la forme d'une poudre blanche, il est photosensible, sa solubilité dans l'eau est de 2 mg/L.

Une dose de 100mg de fipronil est diluée dans l'acétone afin d'obtenir une solution à 20 mg/mL. Ensuite, 5mL de cette solution est mélangé à 30 g de l'aliment habituel des rats. L'aliment ainsi surchargé en fipronil est étalé dans un cristalliseur pendant 12 heures, protégé de la lumière, pour permettre l'évaporation de l'acétone. La totalité des 30 g d'aliment surchargé en fipronil est alors mélangée avec le robot mixeur à 300 grammes d'aliment poudre non traité de façon à obtenir un pré-mélange. Ce pré-mélange est ajouté à 3 kg d'aliment poudre non traité, puis le mélange est malaxé pendant 15 minutes, de façon à obtenir un aliment final qui contient du fipronil à hauteur de 30 mg/kg.

Pour cette expérience 4 lots différents d'aliment ont été préparés de façon séquentielle. Une fraction aliquotée a été prélevée sur chaque lot d'aliment a été stockée à -20°C en vue d'une vérification ultérieure des concentrations en fipronil dans les différents lots d'aliment.

I.1.3. Schéma expérimental

Les lots « traités », A, B, C, D, E et F sont nourris avec l'aliment à 30mg/kg de fipronil. Les lots « contrôles » G, H, et I sont les lots témoins et sont nourris avec de l'aliment standard rat, traité à l'acétone dans les mêmes proportions que l'aliment qui contient le fipronil. Le traitement commence à j0 et s'achève à j29. Quotidiennement, les mangeoires sont pesées afin de noter la quantité d'aliment ingérée depuis la veille.

Le poids des rats est suivi par des pesées hebdomadaires.

Chaque lot traité (A, B, C, D, E, F) est sacrifié à 4 heures d'intervalle alors que les lots contrôles (G, H, I) sont sacrifiés à 8 heures d'intervalle (Tableau 6). Des prélèvements de sang sont effectués par ponction aortique afin d'évaluer la concentration plasmatique en fipronil et en fipronil sulfone son principal métabolite, et pour réaliser un bilan thyroïdien.

Lots traités	Lots contrôles	Heure du sacrifice	Eclaircissement
A	G	10h00	
B		14h00	Obscurité
C	H	18h00	Obscurité
D		22h00	
E	I	02h00	Clarté
F		06h00	Clarté

Tableau 6 : Répartition des lots de rats pour le sacrifice.

I.1.4. Techniques de prélèvement

Après quatre semaines d'expérience, du sang est collecté par ponction aortique sous anesthésie générale profonde (kétamine à 80mg/kg et xylazine à 2,5 mg/kg, par la voie intrapéritonéale). Pour ce faire, l'abdomen est incisé sur la ligne blanche, la masse intestinale est réclinée sur le côté, et l'aorte est cathétérisée à l'aide d'une aiguille épicroténienne abouchée à un tube contenant de l'héparinate de lithium. Le prélèvement est prolongé jusqu'à l'arrêt du flux sanguin et la mort du sujet.

Les tubes sont centrifugés (3000 g pendant 10 minutes à +4°C) et le plasma est décanté dans 3 aliquots congelés et stockés à -20°C. Dans les 5 minutes suivant la mort, la thyroïde est prélevée. Après incision médiale du cou, les deux lobes situés de part et d'autre de la trachée sont disséqués, pesés et disposés dans des tubes contenant du formol 9% neutralisé, et stockés à +4°C.

I.1.5. Dosages

I.1.5.1. Dosage du fipronil et du fipronil sulfone

Le fipronil et son principal métabolite le fipronil sulfone sont dosés par chromatographie liquide haute performance (méthode HPLC) en phase inverse couplée à une détection par fluorescence (à l'aide d'un détecteur UV à 275 nm) après extraction et concentration des échantillons. L'extraction est réalisée à partir de 500 µl de plasma surchargé avec 10 µl une solution de standard interne (desoxycorticostérone 10 µg/ml) et 50 µl d'eau. Ce mélange est passé sur une colonne de silice greffée en C8 (Bond Elut Variant 100mg) et élué avec 500 µl d'acétonitrile à 5 %. Après évaporation sous vapeur d'azote à 40 °C le culot est repris avec 50 µl d'une solution de méthanol à 50%. Le dosage du fipronil est réalisé sur 25 µl de chacun des échantillons concentrés. La phase stationnaire est constituée d'une colonne de silice greffée en C18 (Inertsil ODS3®). La phase mobile est une solution d'acide acétique 0.005 N et Méthanol (33/67 ; v/v) et est injectée par une pompe isocratique à un débit constant de 400 µl/min. Les échantillons et la gamme standard réalisée dans du plasma sont extraits simultanément. La limite de quantification (LOQ) du dosage est de 50 ng/ml et 100 ng/ml pour le fipronil et le fipronil sulfone, respectivement.

La LOQ par HPLC/UV ne permet pas de suivre la phase terminale de l'élimination du fipronil. Certains échantillons ont donc été dosés par HPLC couplée à la spectrométrie de masse. Les échantillons et la gamme étalon sont soumis à une extraction liquide/liquide.

Deux cent microlitres d'échantillon sont ajoutés à 2 ml de TerButylMéthylEther et vortexés puis centrifugés 5 min à 5000g à 5°C. Le surnageant est évaporé à sec puis repris dans 200µl de méthanol à 40% avant adjonction de 150 µl d'hexane. Le mélange est alors centrifugé 5 min à 13000 rpm à 5°C. Le dosage est effectué sur 30 µl de la phase inférieure du mélange sur une phase mobile constituée de méthanol et d'eau contenant 0.1 % d'acide formique et utilisée avec un gradient. La LOQ de la méthode est de 1 ng/ml et 5 ng/ml pour le fipronil et le fipronil sulfone, respectivement.

La comparabilité entre les deux méthodes (HPLC/UV et HPLC/SM) est évaluée en calculant le pourcentage d'écart des valeurs mesurées sur les mêmes échantillons par les deux méthodes (6 échantillons de 432 à 61 ng/ml pour le fipronil et 10 échantillons de 160 à 104 ng/ml pour le sulfone). Les pourcentages moyens d'écart sont respectivement de 14 et 5 % pour le fipronil et le sulfone. Pour un animal donné, les analyses pharmacocinétiques sont donc réalisées sur un jeu de valeur regroupant les mesures effectuées avec les deux méthodes.

I.1.5.2. Dosages hormonaux

I.1.5.2.1. Dosage de la T3 et de la T4

Les hormones thyroïdiennes sont dosées par méthode immuno-enzymatique ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay), à l'aide de 4 kits de dosage *DSL*® (références : 10-3200 pour la TT4; 10-40100 pour la FT4; 10-3100s pour la TT3; 10-41100 pour la FT3).

La sensibilité est évaluée grâce au seuil minimum de détection, qui est la concentration théorique moyenne correspondant à un pourcentage de la liaison du traceur égal au pourcentage de la liaison moyenne du standard 0 moins 2 écart-types (par rapport au standard 0). Les valeurs des sensibilités des techniques de dosage sont de 1,8 ng/mL pour la TT4, de 4 pg/mL pour la TT3, de 0,5 pg/mL pour la FT4 et de 0,05 pg/mL pour la FT3. Les coefficients de variation maximum intradosage sont de 8% pour la TT4, de 7,8% pour la FT4, de 7,9% pour la TT3, de 11,9% pour la FT3.

I.1.5.2.2. Dosage de la TSH des rats

La TSH spécifique du rat, a été dosée par une méthode radio-immunologique, à l'aide d'un kit de dosage d'*Amersham Biosciences*® (référence : RPA 554).

La sensibilité de la technique est évaluée de 2 façons, la première consiste en la détermination de la concentration de TSH qui permet de déplacer 50% du traceur (la TSH marquée), encore appelé EC50. La valeur de l'EC50 est de 9,05 ng/mL.

La sensibilité peut également être évaluée grâce au seuil minimum de détection, qui est la concentration théorique moyenne correspondant à un pourcentage de la liaison du traceur égal au pourcentage de la liaison moyenne du standard 0 moins 2 écart-types (par rapport au standard 0). Sa valeur est de 0,5 ng/mL.

Le coefficient de variation intra-dosage pour un pool de plasma, déplaçant 76% de la liaison maximum est de 11%.

I.1.6. Analyse des données

Les données concernant les poids corporels des rats, et les concentrations plasmatiques d'hormones thyroïdiennes et de fipronil sulfone sont analysées avec le logiciel *systat*® (*Systat 10, Systat Software Inc., Richmond, California, USA*).

- L'analyse des données des poids corporels, sur la base d'un modèle général linéaire, repose sur la formule suivante qui teste l'hypothèse d'un effet du traitement (groupe) et/ou du temps sur l'évolution des poids corporels des rats :

$$Y_{i,j,k} = \mu + G_i + I_{ij} + T_k + G_i * T_k + \epsilon_{i,j,k} \quad (\text{équation 1})$$

$Y_{i,j,k}$ est la réponse observée pour l'individu j appartenant au groupe i (traité ou contrôle), au temps k .

μ est l'effet moyen général.

G_i est l'effet du groupe i (avec i de 1 à 2, traités ou contrôles).

I_{ij} est l'effet de l'individu j dans le groupe i qui représente les 36 rats.

T_k est l'effet du temps k qui représente les 28 jours de traitement.

$G_i * T_k$ est l'effet de l'interaction du groupe i avec le temps k .

$\epsilon_{i,j,k}$ est le terme d'erreur du modèle.

- Les données concernant les concentrations plasmatiques d'hormones thyroïdiennes, de TSH et de fipronil sulfone sont analysées grâce à un modèle général linéaire dont la formule, qui teste l'hypothèse d'un effet de l'heure de prélèvement sur l'évolution de ces concentrations plasmatiques, est :

$$Y_{i,j} = \mu + L_i + I_{ij} + \epsilon_{i,j} \quad (\text{équation 2})$$

$Y_{i,j}$ est la réponse observée pour l'individu j appartenant au lot i (lot de 4 rats sacrifiés à la même heure).

μ est l'effet moyen général.

L_i est l'effet du lot i qui représente l'heure du sacrifice au cours de la journée (Les sacrifices avaient lieu toutes les 4 heures).

I_{ij} est l'effet de l'individu j qui représente les 36 rats.

$\epsilon_{i,j}$ est le terme d'erreur du modèle.

On recherche si il y a un effet du lot c'est-à-dire de l'heure de prélèvement au cours de la journée.

- Ensuite, on cherche à tester l'effet du traitement sur les concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes et en TSH. Ainsi, s'il n'y a pas d'effet de l'heure de prélèvement, les moyennes des groupes traités et des groupes non traités seront analysées par un test t non apparié qui nécessite la réalisation au préalable d'un test d'homogénéité des variances.
- Les données concernant l'ingestion d'aliment par les lots de rats ne sont pas analysées statistiquement mais sont interprétées à partir des courbes obtenues.

I.2. Résultats

I.2.1. Suivi des poids des rats

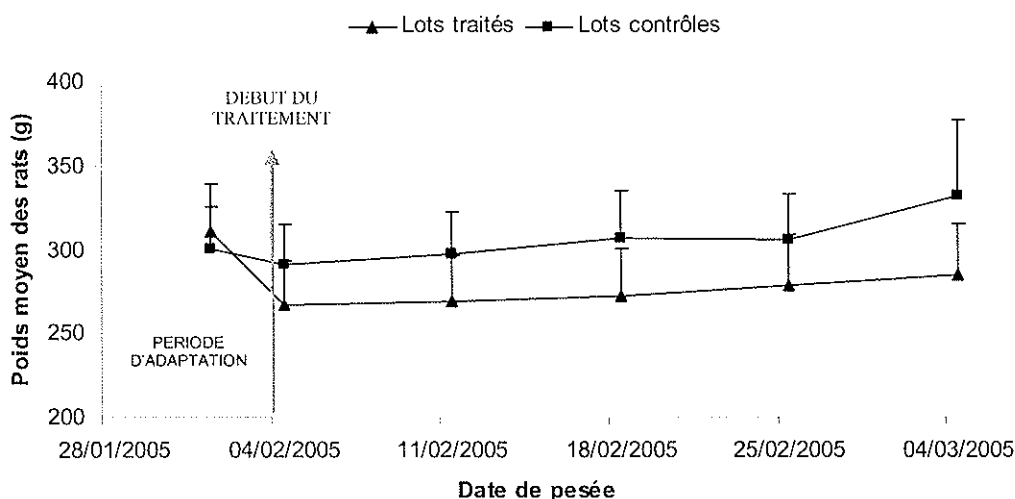


Figure 5 : Evolution des poids corporels moyens (\pm ET) des lots de rats traités au fipronil par voie orale (30 mg/kg d'aliment) sur une période de 28 jours et des lots de rats contrôles, pesés hebdomadairement (en grammes).

En ce qui concerne les lots contrôles, seuls les rats appartenant au lot G sont pris en compte par ce graphique car les lots H et I ont été rajoutés dans l'expérimentation au 11/02/2005.

Il n'y a pas d'effet du temps de l'expérimentation sur les valeurs des poids corporels ($p > 0,05$).

Il n'y a pas d'effet d'interaction entre le temps et le groupe de rats (traités ou non) donc les groupes évoluent de la même façon en fonction du temps ($p > 0,05$). On observe une perte de poids au début mais le poids reste stable tout au long de l'expérimentation. Les rats appartenant aux lots contrôles ont un poids moyen (pour la durée totale de traitement au fipronil) de 305,7 grammes alors que les rats des lots traités au fipronil ont un poids moyen de 280,4 grammes. Mais il n'y a pas d'effet du groupe ($p > 0,05$) (Figure 5).

I.2.2. Ingestion du fipronil

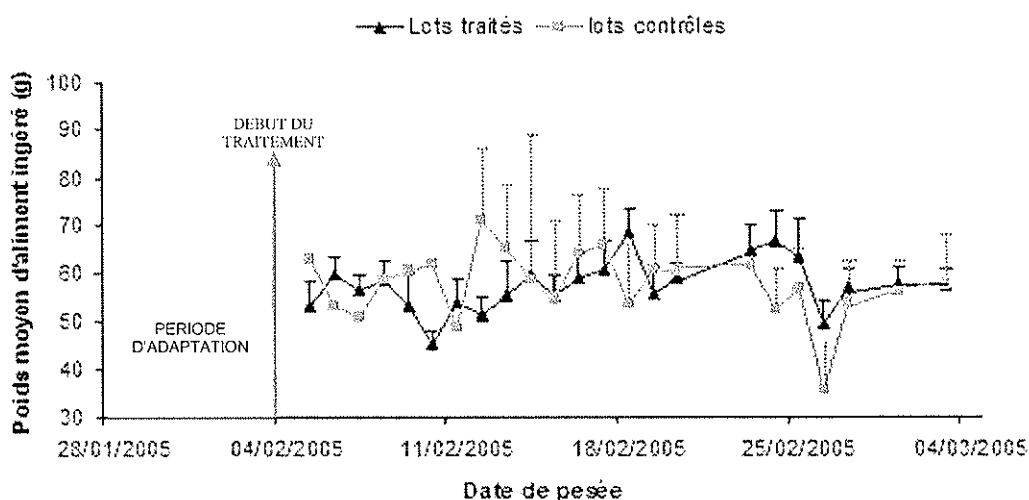


Figure 6 : Evolution de l'ingestion moyenne d'aliment (\pm ET) des lots de rats traités au fipronil par voie orale (30mg/kg d'aliment) sur une période de 28 jours et des lots de rats contrôles, mesurée quotidiennement (en grammes).

Les données sur les lots contrôles, ne prennent en compte que les données concernant le lot G car les lots H et I ont été rajoutés dans l'expérimentation au 11/02/2005.

L'ingestion moyenne d'aliment est de 57,5 g/j et par lot soit, 14,4 grammes d'aliment par rat et par jour. En outre, l'ingestion moyenne des lots de rats traités est de 57,5 grammes et l'ingestion moyenne des lots de rats non traités est de 57,7 grammes (Figure 6).

La concentration moyenne en fipronil des 4 lots d'aliments préparés est de 29,80 mg/kg alors que la concentration nominale est de 30 mg/kg. La teneur des aliments en fipronil est donc satisfaisante.

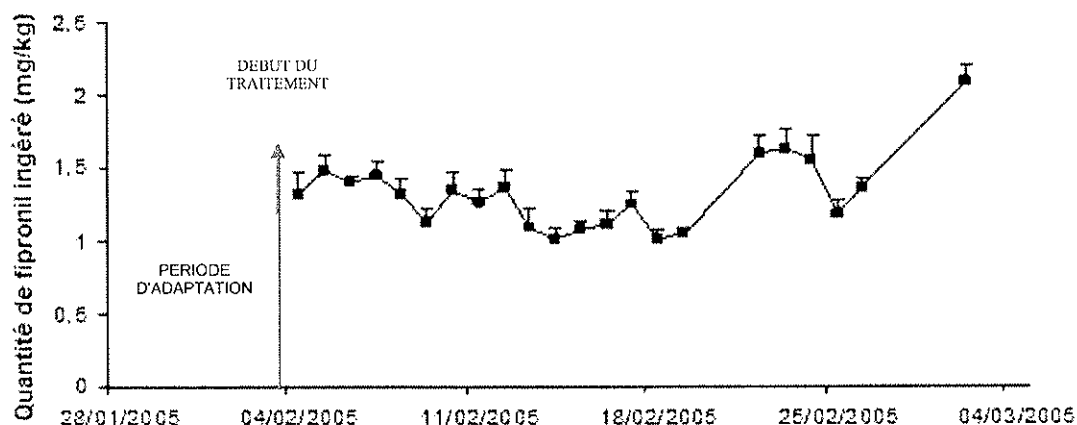


Figure 7 : Evolution de la dose ingérée moyenne de fipronil (\pm ET) par les rats traités au fipronil par voie orale (30mg/kg d'aliment) sur une période de 28 jours, évaluée quotidiennement (en mg/kg).

La dose ingérée moyenne de fipronil par jour varie assez peu au cours des 28 jours de traitement, elle s'élève en moyenne à 1,32 mg/kg de poids corporel (Figure 7).

I.2.3. Concentrations plasmatiques du fipronil et du fipronil sulfone chez les rats

I.2.3.1. Concentration plasmatique du fipronil chez les rats

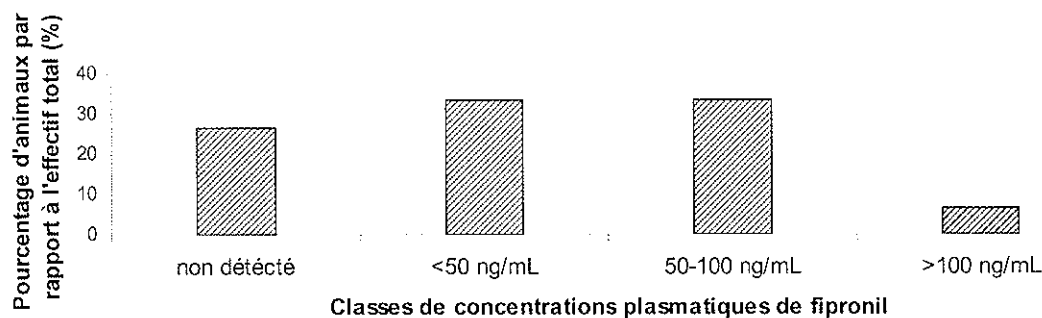


Figure 8 : Fréquence de répartition par classe de concentration plasmatique en fipronil. Les concentrations plasmatiques en fipronil ont été mesurées après 28 jours, chez des rats traités au fipronil par voie orale (30 mg/kg d'aliment).

Les valeurs des concentrations plasmatiques du fipronil sont très dispersées. Parmi les échantillons provenant de rats traités au fipronil, on trouve 4 échantillons pour lesquels le fipronil n'est pas détectable et 8 échantillons pour lesquels la concentration de fipronil est en dessous de la limite de quantification qui est de 50 ng/mL pour les dosages réalisés en HPLC. La plupart des dosages provenant de rats traités au fipronil montrent des concentrations plasmatiques situées entre 50 et 100 ng/mL (Figure 8). Il n'y a pas de répartition préférentielle des lots en fonction des classes de concentrations.

Ainsi, au regard de la fréquence de répartition des classes de concentrations plasmatiques de fipronil, on estime la concentration moyenne en fipronil chez le rat traité à 50ng/mL. On estime alors l'aire sous la courbe sur 24 heures qui est donnée par l'équation :

$$AUC_{(0-24h)} = C_{moyenne} \times 24 \text{ h} \quad (\text{équation 3})$$

$AUC_{(0-24h)}$ représente l'aire sous la courbe sur 24 heures, $C_{moyenne}$ représente la concentration moyenne en fipronil chez le rat soit environ 50 ng/mL.

L'aire sous la courbe sur 24 heures est donc estimée à 1,2 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$.

Le fipronil est également dosé chez des rats non traités à titre de contrôle. Deux rats par lots contrôles (G, H et I) sont choisis pour ce dosage, soit au total 6 dosages réalisés dont 4 pour

lesquels le fipronil n'est pas détectable et 2 pour lesquels des valeurs sont présentées comme des résultats d'interférence.

1.2.3.2. Concentration plasmatique du fipronil sulfone chez les rats

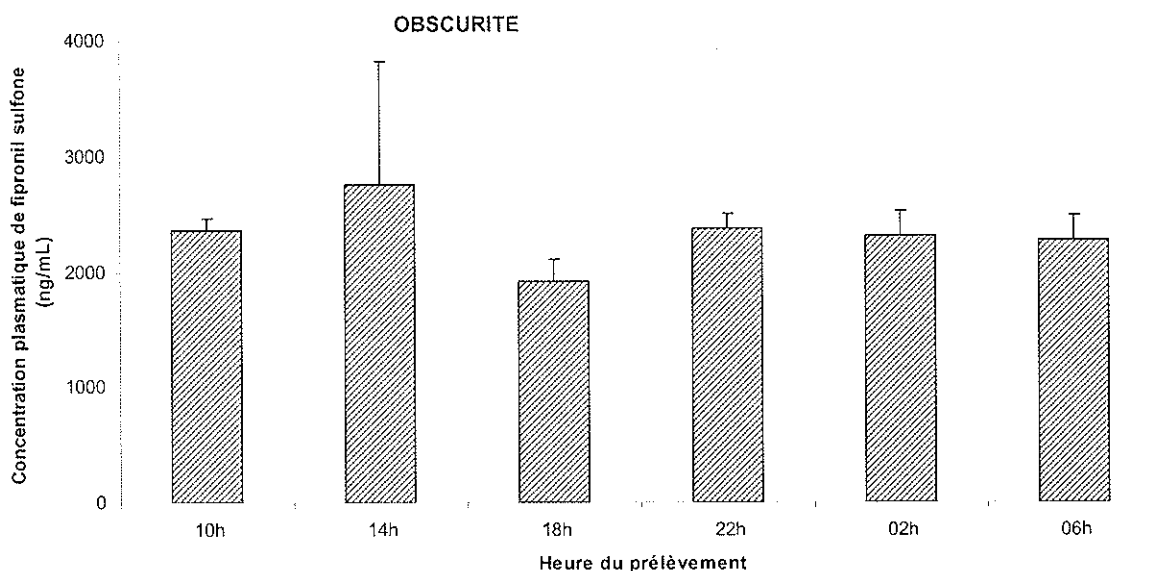


Figure 9 : Concentrations plasmatiques moyennes de fipronil sulfone (\pm ET) en fonction du moment de la journée. Les concentrations plasmatiques en fipronil sulfone ont été mesurées chez des rats traités au fipronil par voie orale (30mg/kg d'aliment) pendant une période de 28 jours. Un lot de rats était sacrifié toutes les 4 heures à partir de 10h à J28.

Contrairement au fipronil, le fipronil sulfone est détecté chez tous les animaux. Il n'y a pas d'effet significatif de l'heure de prélèvement sur les concentrations plasmatiques de fipronil sulfone ($p > 0,05$). La concentration moyenne de fipronil sulfone chez les rats traités est de 2332 ng/mL. Les concentrations plasmatiques de fipronil sulfone sont toutes supérieures à 1700 ng/mL, elles sont donc beaucoup plus élevées que les concentrations plasmatiques de fipronil (Figure 9). On estime alors l'aire sous la courbe sur 24 heures qui est donnée par l'équation :

$$AUC_{(0-24h)} = C_{\text{moyenne}} \times 24 \text{ h} \quad (\text{équation 4})$$

$AUC_{(0-24h)}$ représente l'aire sous la courbe sur 24 heures, C_{moyenne} représente la concentration moyenne en fipronil sulfone chez le rat soit 2332 ng/mL.

L'aire sous la courbe sur 24 heures est donc estimée à 56 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$.

Le fipronil sulfone est également recherché chez les rats non traités. De même que pour le dosage du fipronil, 2 rats par lots contrôles (G, H et I) sont choisis. Chez ses derniers, le fipronil sulfone n'est pas détectable.

I.2.4. Résultats des dosages hormonaux

I.2.4.1. Concentrations plasmatiques de triiodothyronine (T3) et de thyroxine (T4)

I.2.4.1.1. Concentration plasmatique en thyroxine

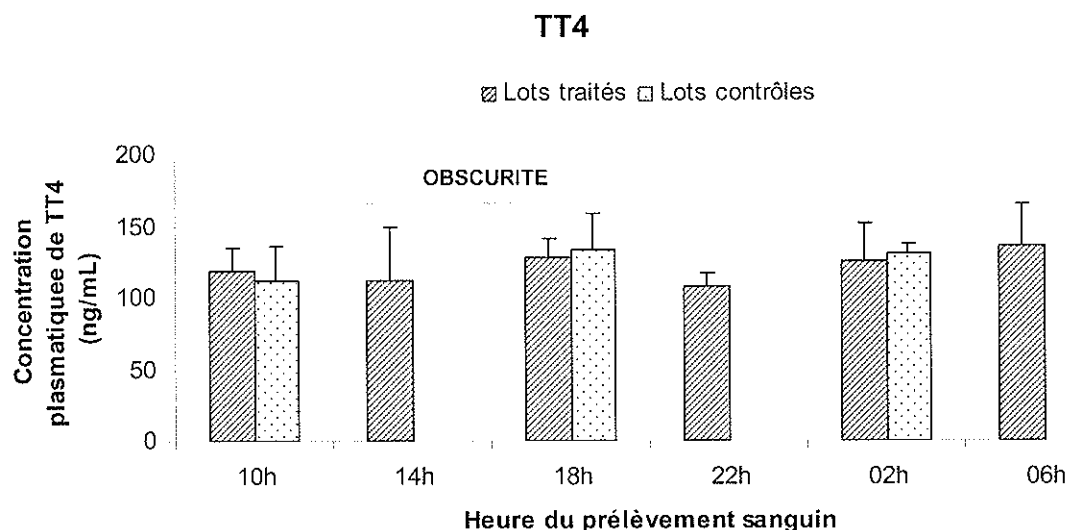


Figure 10 : Concentrations plasmatiques (\pm ET) de thyroxine totale (TT4) en fonction du moment de la journée : Les concentrations ont été mesurées chez des rats traités au fipronil par voie orale (30mg/kg d'aliment) pendant une période de 28 jours puis sacrifiés toutes les 4 heures pendant 24 heures et chez des rats contrôles sacrifiés toutes les 8 heures.

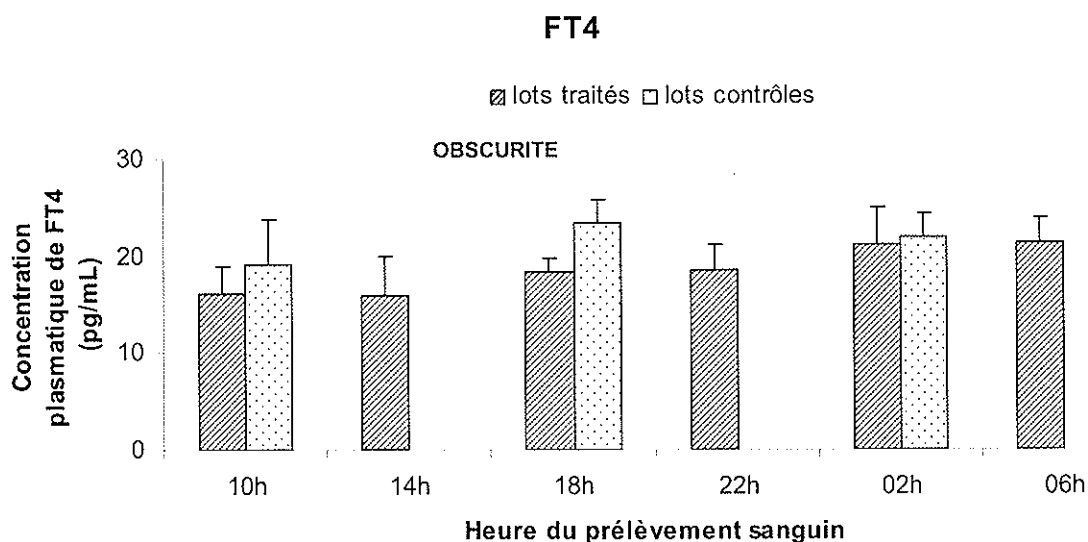


Figure 11 : Concentrations plasmatiques (\pm ET) de thyroxine libre (FT4) en fonction du moment de la journée : Les concentrations ont été mesurées chez des rats traités au fipronil par voie orale (30mg/kg d'aliment) pendant une période de 28 jours puis sacrifiés toutes les 4 heures pendant 24 heures et chez des rats contrôles sacrifiés toutes les 8 heures.

Les valeurs des concentrations plasmatiques totales de thyroxine (Figure 10) et des concentrations plasmatiques de thyroxine libre (Figure 11) varient peu entre les lots traités et les lots contrôles, il n'y a pas d'effet du traitement ($p>0,05$). De plus, elles varient peu au cours de la journée, il n'y a pas d'effet de l'heure de prélèvement chez les lots traités ($p>0,05$).

I.2.4.1.2. Concentration plasmatique en triiodothyronine

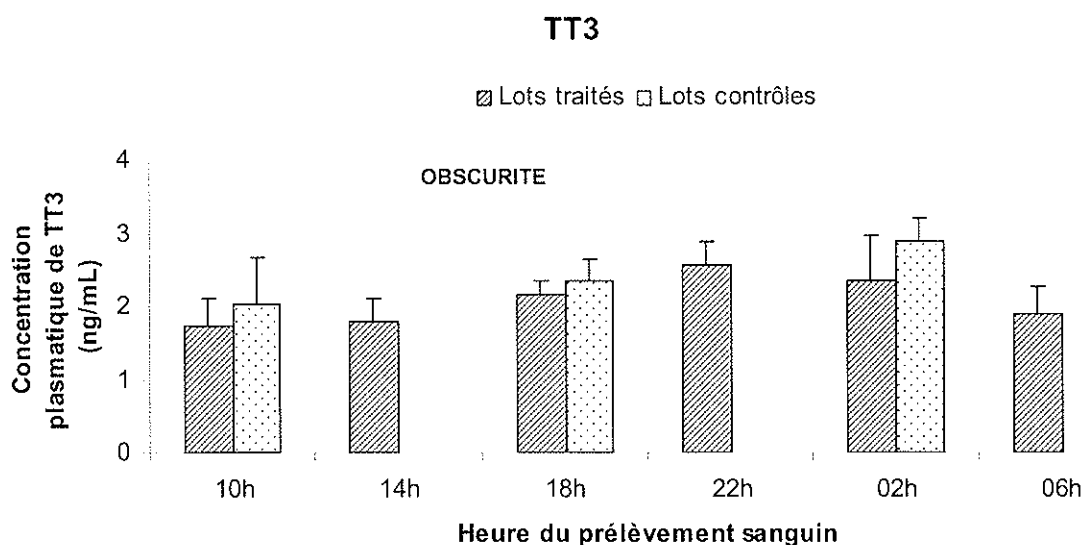


Figure 12 : Concentrations plasmatiques (\pm ET) de triiodothyronine totale (TT3) en fonction du moment de la journée : Les concentrations ont été mesurées chez des rats traités au fipronil par voie orale (30mg/kg d'aliment) pendant une période de 28 jours puis sacrifiés toutes les 4 heures pendant 24 heures et chez des rats contrôles sacrifiés toutes les 8 heures.

Les valeurs des concentrations plasmatiques totales de triiodothyronine (Figure 12) varient peu entre les lots traités et les lots contrôles, il n'y a pas d'effet du traitement ($p>0,05$). Cependant, elles varient un peu au cours de la journée, il y a un effet de l'heure de prélèvement chez les lots traités ($p<0,05$).

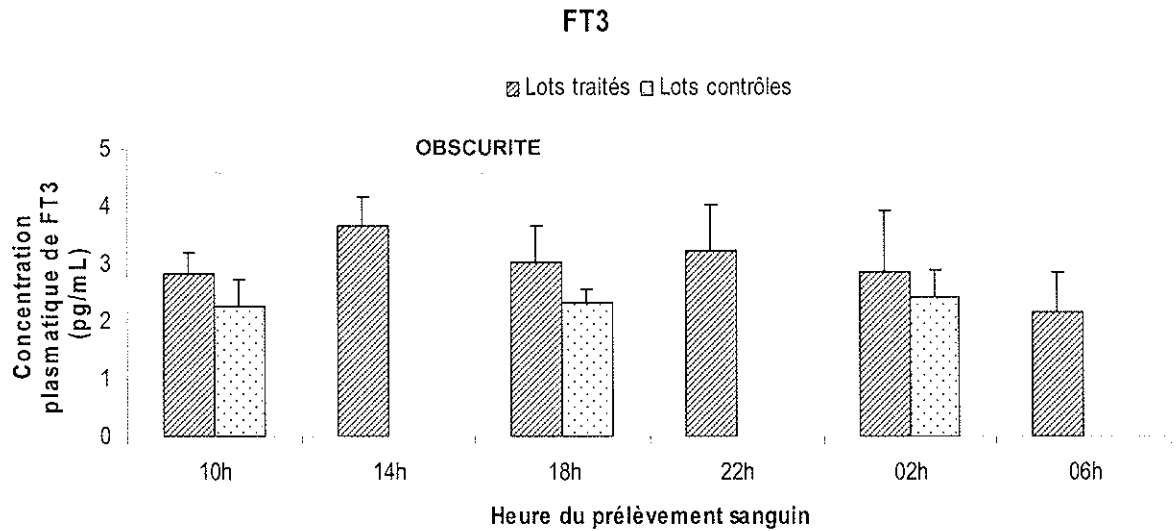


Figure 13 : Concentrations plasmatiques (\pm ET) de triiodothyronine libre (FT3) en fonction du moment de la journée : Les concentrations ont été mesurées chez des rats traités au fipronil par voie orale (30mg/kg d'aliment) pendant une période de 28 jours puis sacrifiés toutes les 4 heures pendant 24 heures et chez des rats contrôles sacrifiés toutes les 8 heures.

Il y a un effet du traitement sur les concentrations plasmatiques de FT3. Celles-ci sont significativement supérieures chez les rats traités que chez les rats contrôles ($p < 0,01$) (Figure 13). Ces concentrations varient peu au cours de la journée, il n'y a pas d'effet de l'heure de prélèvement ($p > 0,05$).

Les concentrations en hormones thyroïdiennes mesurées ne révèlent pas de variations conséquentes liées à l'heure de prélèvement (hormis la TT3). Ainsi, dans le paragraphe qui suit nous considérerons les valeurs moyennes des concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes dans le groupe des rats traités et dans le groupe des rats contrôles.

I.2.4.1.3. Bilan du dosage des hormones thyroïdiennes chez le rat

		Thyroxine libre FT4 (pg/mL)	Thyroxine totale TT4 (ng/mL)	Triiodothyronine libre FT3 (pg/mL)	Triiodothyronine totale TT3 (ng/mL)
CONCENTRATIONS	Lots traités	19,70 ±3,3	121,24 ±25,5	2,96 ±0,8*	2,09 ±0,5
	Lots contrôles	20,24 ±4,5	130,54 ±23,8	2,38 ±0,4*	2,17 ±0,8
RAPPORT (%)	Lots traités / Lots contrôles	97	93	124*	96
FRACTION LIBRE (%)	Lots traités	0,016		0,14	
	Lots contrôles	0,015		0,11	

Tableau 7 : Concentrations moyennes en hormones thyroïdiennes libres (pg/mL) et totales (ng/mL), fractions libres et rapports des concentrations, dans le lot traité au fipronil par voie orale (30 mg/kg d'aliment) pendant une période de 28 jours et dans le lot contrôle. (* = p<0,05).

La concentration en triiodothyronine libre du lot traité est significativement supérieure de 24% à celle du lot contrôle (p<0,01). Les valeurs des concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes sont 2 à 3 fois supérieures aux valeurs de la littérature. Par contre, les valeurs des fractions libres de thyroxine et de triiodothyronine sont proches des valeurs publiées par la littérature (Tableau 7).

I.2.4.2. Concentration plasmatique en TSH

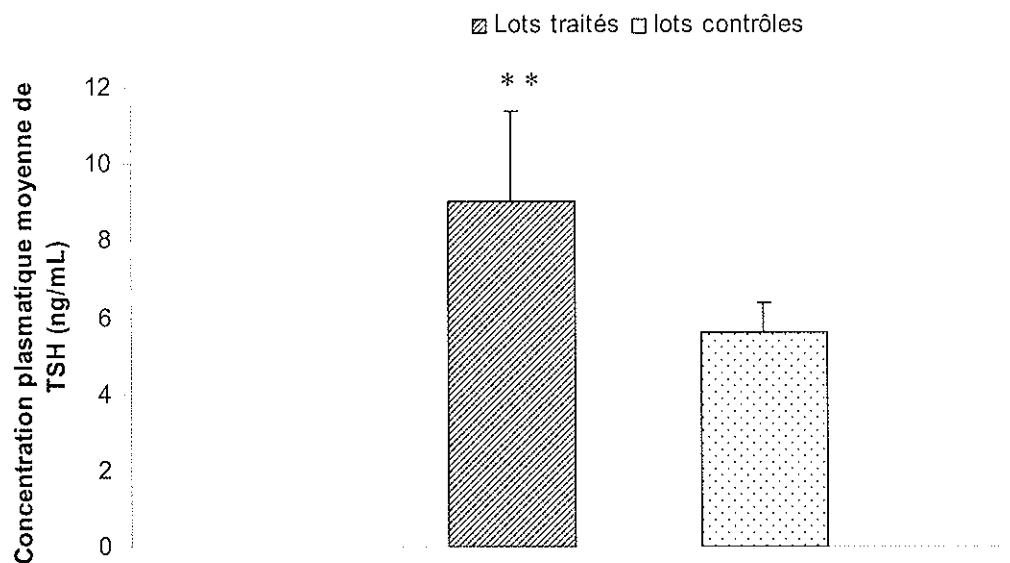


Figure 14 : Concentrations plasmatiques (\pm ET) de TSH (Thyroid stimulating hormone)** chez les rats traités au fipronil par voie orale (30 mg/kg d'aliment) pendant une période de 28 jours et chez les rats contrôles non traités (** = $p < 0,005$).

Il n'y a pas d'effet de l'heure de prélèvement sur les concentrations plasmatiques de TSH ($p > 0,05$). La concentration plasmatique moyenne en TSH des rats des lots traités est de 9,02 ng/mL alors que celle des rats appartenants aux lots contrôles est de 5,64 ng/mL. La différence est hautement significative ($p < 0,005$), la concentration plasmatique en TSH du lot traité au fipronil augmente de 59% par rapport à la concentration plasmatique en TSH du lot contrôle (Figure 14).

II. Pharmacocinétique du fipronil chez les ovins : détermination d'un schéma posologique

II.1. Matériels et méthodes

II.1.1. Animaux

Cette expérience a été réalisée sur trois ovins femelles pubères de race Lacaune et âgées de 6 mois. Les brebis sont pesées et installées dans des cages à métabolisme individuelles, au moins 1 semaine avant le début de l'expérience pour permettre une bonne habitude. Vingt-quatre heures avant le début de l'expérience, des cathéters veineux sont insérés de façon aseptique dans chacune des veines jugulaires.

II.1.2. Produit, préparation et administration

Le fipronil utilisé est du *Fipronil SG Sigma France*, référence n° 46451, dissout extemporanément dans 2 volumes d'éthanol absolu et 1 volume d'eau stérile pour injection pour obtenir une solution à 10 mg/mL. La dose injectée est de 1 mg/kg au temps noté t0. Le cathéter utilisé pour l'injection est ensuite retiré.

II.1.3. Schéma expérimental

Les échantillons de sang sont prélevés 3 fois à 15 minutes d'intervalle avant le début de l'expérience. Puis ils sont prélevés à t0 (début de l'expérience), t1 (1 minute), t2, t4, t8, t15, et toutes les 15 minutes jusqu'à t180 minutes. Ensuite, le sang est prélevé toutes les 12 heures pendant 21 jours, et toutes les semaines jusqu'au 90ème jour après le début de l'expérience.

II.1.4. Techniques de prélèvement

La collecte des échantillons de sang s'effectue grâce à une seringue que l'on connecte au cathéter mis à demeure. Le sang prélevé est alors placé dans un tube à héparinate de lithium, identifié avec le numéro de l'animal. Le cathéter est rincé au sérum physiologique après chaque prélèvement sanguin. Les tubes de sang sont centrifugés (3000 g pendant 10 minutes à +4°C) et le plasma est décanté en plusieurs aliquots puis congelé et stocké à -20°C jusqu'au dosage.

II.1.5. Techniques de dosage du fipronil et du fipronil sulfone

Le fipronil et le fipronil sulfone sont dosés selon deux techniques : une HPLC (chromatographie liquide haute performance) suivie d'une détection UV ou, une HPLC suivie

d'une détection par spectrométrie de masse. La méthode HPLC suivie d'une détection UV utilisée est la même méthode que celle décrite précédemment (Cf. I.1.5.1), sa limite de quantification inférieure est de 50 ng/mL pour le fipronil et de 100 ng/mL pour le fipronil sulfone. La méthode HPLC suivie d'une spectrométrie de masse a quant à elle une limite de quantification inférieure de 1ng/mL pour le fipronil et pour le fipronil sulfone. Le dosage du fipronil par ces deux méthodes révèle une très bonne comparabilité, ainsi l'analyse des données pharmacocinétiques porte sur le cumule des données des deux méthodes (Cf. I.1.5.1.). La limite de détection du fipronil sulfone est trop élevée dans la méthode HPLC c'est pourquoi on utilise les valeurs de fipronil sulfone obtenues par la méthode de détection par spectrométrie de masse.

II.1.6. Analyse des données

II.1.6.1. Analyse des données pharmacocinétiques du fipronil

Les données concernant la pharmacocinétique du fipronil chez le mouton sont traitées par le logiciel *WinNonLin*® (*WinNonLin 4.0.1, Pharsight Products, Mountain view, California, USA*). Le logiciel effectue une pondération au $1/Y^2$ estimé sur les valeurs obtenues.

Les calculs sont faits sur la base d'un modèle tricompartimental avec injection d'un bolus IV de fipronil, sans délai entre l'administration et l'apparition de la substance, et comprenant une cinétique d'élimination du premier ordre.

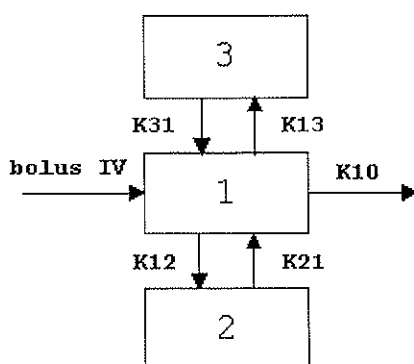


Figure 15 : Modèle compartimental de la cinétique du fipronil chez le mouton.

Le compartiment central, ou compartiment plasmatique est représenté par le rectangle n°1. Les rectangles n°2 et n°3 représentent des compartiments périphériques qui échangent du fipronil avec le compartiment central. Toute l'élimination se fait à partir du compartiment central (Figure 15).

L'équation modélisant l'évolution de la concentration au cours du temps, $C(t)$, est :

$$C(t) = A \times e^{-\alpha t} + B \times e^{-\beta t} + C \times e^{-\gamma t} \quad (\text{équation 5})$$

Les symboles A, B, C, sont les constantes pré-expérimentales (ng/mL) et α , β et γ sont les constantes de temps (h^{-1}).

Les paramètres pharmacocinétiques sont calculés pour une dose unique administrée IV à t_0 , et à partir des constantes sur la base des équations suivantes (Labaune, 1988) :

L'aire sous la courbe, AUC est donnée par :

$$\text{AUC} = A/\alpha + B/\beta + C/\gamma \quad (\text{équation 6})$$

La clairance, Cl est donnée par :

$$\text{Cl} = \text{dose}/\text{AUC} \quad (\text{équation 7})$$

Le volume du compartiment central, V_c , est donné par :

$$V_c = \text{dose} / (A + B + C) \quad (\text{équation 8})$$

Le volume de distribution à l'équilibre, V_{ss} , est donné par :

$$V_{ss} = V_c (1 + K_{12}/K_{21} + K_{13}/K_{31}) \quad (\text{équation 9})$$

Le temps moyen de résidence, MRT, est donné par :

$$\text{MRT} = (A/\alpha^2 + B/\beta^2 + C/\gamma^2) / (A/\alpha + B/\beta + C/\gamma) \quad (\text{équation 10})$$

Le temps de demi-vie, $t_{1/2}$, est donné par :

$$t_{1/2} = \ln 2/\gamma \quad (\text{équation 11})$$

II.1.6.2. Analyse des données pharmacocinétiques du fipronil sulfone

Les données concernant la pharmacocinétique du fipronil sulfone chez le mouton sont également traitées par le logiciel *WinNonLin*®. Les calculs sont faits sur la base d'un modèle extravasculaire bicompartimental, avec un délai entre l'injection de fipronil et l'apparition de fipronil sulfone, et incluant une cinétique d'élimination du premier ordre.

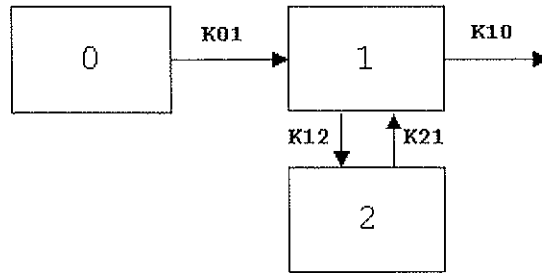


Figure 16 : Modèle compartimental de la cinétique du fipronil sulfone chez le mouton.

Le rectangle n°0 représente le pool de fipronil à partir duquel se fait la transformation en fipronil sulfone. Le compartiment central, ou compartiment plasmatique est représenté par le rectangle n°1. Le rectangle n°2 représente un compartiment périphérique qui échange du fipronil sulfone avec le compartiment central. Toute l'élimination du fipronil sulfone se fait à partir du compartiment central (Figure 16).

L'équation modélisant l'évolution de la concentration au cours du temps est :

$$C(t) = A \times e^{-\alpha t} + B \times e^{-\beta t} + C \times e^{-k_0 t} \quad (\text{équation 12})$$

Les symboles A, B, C, sont les constantes pré-expérimentales (ng/mL) et α , β et k_0 sont les constantes de temps (h^{-1}) du modèle.

Les équations sur lesquelles repose le calcul des paramètres pharmacocinétiques du fipronil sulfone sont les mêmes que celles décrites pour le calcul des paramètres pharmacocinétiques du fipronil.

II.2. Résultats

II.2.1. Paramètres pharmacocinétiques du fipronil et du fipronil sulfone

II.2.1.1. Paramètres pharmacocinétiques du fipronil chez le mouton

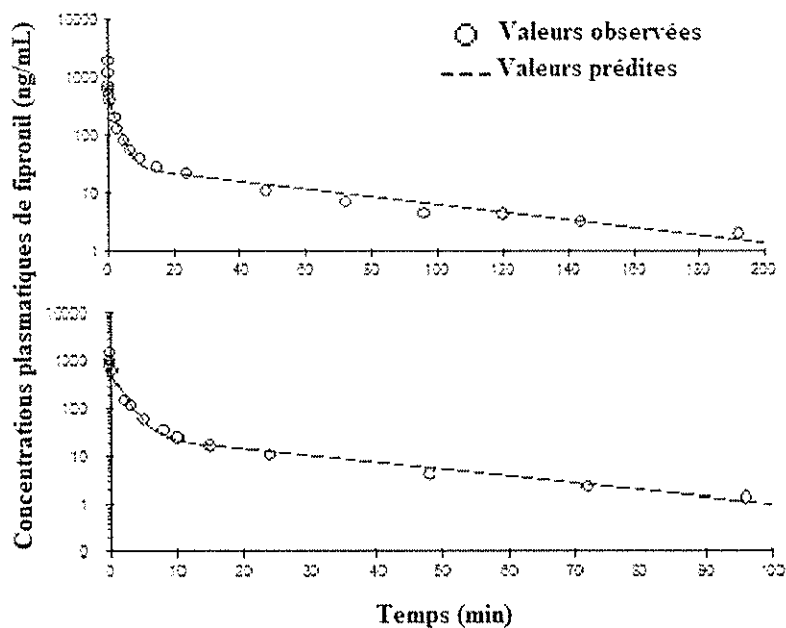


Figure 17 : Courbes de décroissance des valeurs observées et des valeurs prédites des concentrations plasmatiques de fipronil en fonction du temps, chez 2 brebis ayant reçu un bolus IV de fipronil (1mg/kg) à t0.

Les graphiques (Figure 17) représentant l'ajustement obtenu par le logiciel entre les valeurs observées et les valeurs prédites des concentrations plasmatiques en fipronil montrent, chez les deux brebis, que l'ajustement est bon.

Les graphiques qui représentent le rapport entre les valeurs prédites pondérées des concentrations plasmatiques en fipronil et les valeurs des résidus pondérés montrent une bonne répartition des résidus de part et d'autre de l'axe central ce qui indique que la pondération effectuée par le logiciel est équilibrée.

Les valeurs des paramètres pharmacocinétiques du fipronil déterminées par le logiciel sont les suivantes (Tableaux 8 et 9) :

Valeur des macroconstantes	
A	2097 ng/mL
B	537,5 ng/mL
C	29 ng/mL
α	37 h ⁻¹
β	0,515 h ⁻¹
γ	0,024 h ⁻¹

Tableau 8 : Valeurs des constantes moyennes estimées à partir de la modélisation de l'évolution des concentrations plasmatiques de fipronil au cours du temps, sur la base d'un système tricompartemental, après l'injection d'un bolus IV de fipronil (1mg/kg) à t0.

Ainsi une équation moyenne modélisant l'évolution de la concentration de fipronil au cours du temps, chez le mouton, serait :

$$C(t) = 2097 \times e^{-37t} + 537,5 \times e^{-0,515t} + 29 \times e^{-0,024t} \quad (\text{équation 13})$$

Paramètres pharmacocinétiques du fipronil chez le mouton	
Concentration maximale	2663 ng/mL
Clairance	427 mL/h/kg
Temps de demi-vie terminal	33 h
Temps de résidence moyen	27 h
Volume de distribution	10,33 L/kg
Aire sous la courbe	1089 hr \times ng/mL

Tableau 9 : Valeurs des principaux paramètres pharmacocinétiques du fipronil chez le mouton estimés à partir de la modélisation de l'évolution des concentrations plasmatiques de fipronil au cours du temps, sur la base d'un système tricompartemental, après l'injection d'un bolus IV de fipronil (1mg/kg) à t0.

Le temps de demi-vie du fipronil (gamma HL) chez le mouton est de 33 heures. Le volume de distribution est de 10,33 L/kg. Le volume de distribution du fipronil est important car il est très supérieur au volume plasmatique (Tableau 9).

II.2.1.2. Paramètres pharmacocinétiques du fipronil sulfone chez le mouton

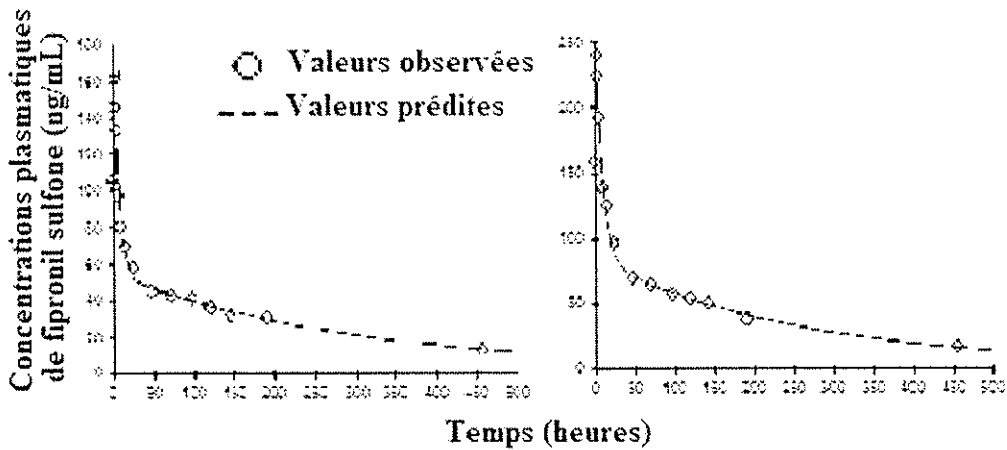


Figure 18 : Courbes de décroissance des valeurs observées et des valeurs prédites des concentrations plasmatiques de fipronil sulfone en fonction du temps, chez 2 brebis ayant reçu un bolus IV de fipronil (1mg/kg) à t0.

Les graphiques (Figure 18) représentant l’ajustement obtenu par le logiciel entre les valeurs observées et les valeurs prédites des concentrations plasmatiques de fipronil sulfone chez les brebis, montrent que l’ajustement est bon.

Les graphiques qui représentent le rapport entre les valeurs prédites pondérées des concentrations plasmatiques en fipronil sulfone et les valeurs des résidus pondérés montrent une bonne répartition des résidus de part et d’autre de l’axe central ce qui indique que la pondération effectuée par le logiciel est équilibrée.

Les valeurs des paramètres pharmacocinétiques du fipronil sulfone déterminées par le logiciel sont les suivantes (Tableaux 10 et 11) :

Valeur des microconstantes	
A	165,94 ng/mL
B	67,85 ng/mL
α	0,126 1/h
β	0,00345 1/h

Tableau 10 : Valeurs des constantes moyennes estimées à partir de la modélisation de l’évolution des concentrations plasmatiques de fipronil sulfone au cours du temps, sur la base d’un modèle extravasculaire bicompartimental, avec un délai entre l’injection IV de fipronil (1mg/kg à t0) et l’apparition de fipronil sulfone.

Paramètres pharmacocinétiques du fipronil sulfone chez le mouton	
Temps de demi-vie	204 h
Concentration maximale	199 ng/mL
Temps d'occurrence de la concentration maximale	1,46 h
Aire sous la courbe	20309,8 hr×ng/mL

Tableau 11 : Valeurs des principaux paramètres pharmacocinétiques du fipronil sulfone chez le mouton estimés à partir de la modélisation de l'évolution des concentrations plasmatiques de fipronil sulfone au cours du temps, sur la base d'un modèle extravasculaire bicompartimental, avec un délai entre l'injection IV de fipronil (1mg/kg à t0) et l'apparition de fipronil sulfone.

Les paramètres pharmacocinétiques dépendant de la dose ne sont pas présentés car la dose de fipronil sulfone n'est pas connue. La demi-vie terminale du sulfone (bêta HL) est estimée à 204 heures alors que la demi-vie terminale du fipronil est de 33 heures (Tableaux 9 et 11). Ainsi, le fipronil sulfone persiste beaucoup plus longtemps que le fipronil dans l'organisme du mouton.

II.2.1.3. Evolution des concentrations plasmatiques du fipronil et du fipronil sulfone en fonction du temps chez la brebis

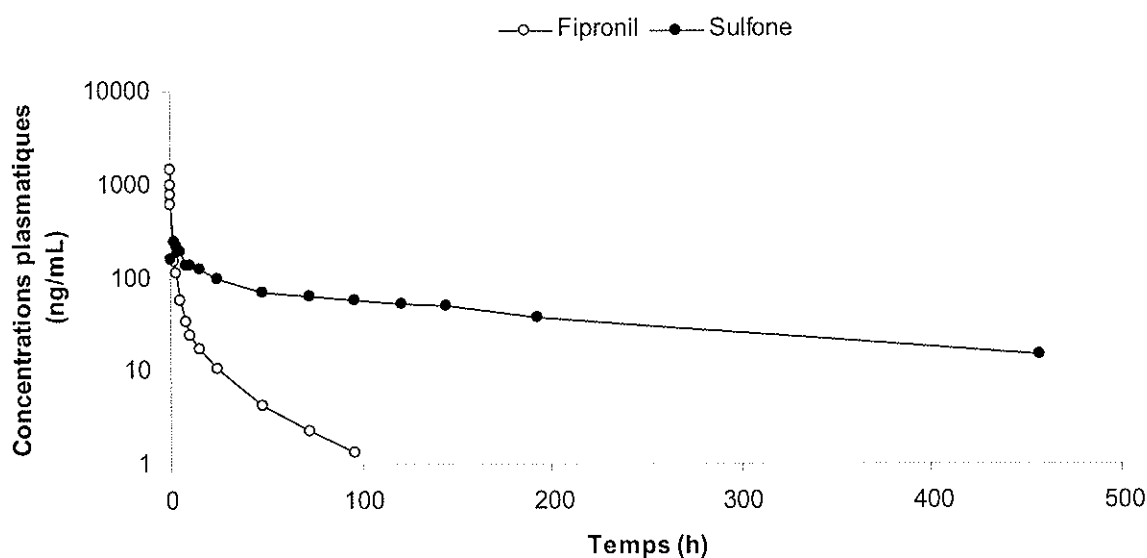


Figure 19 : Evolution des concentrations plasmatiques (ng/mL) de fipronil et de fipronil sulfone en échelle logarithmique, au cours du temps, après injection d'un bolus IV de 1mg/kg, chez un sujet représentatif. La limite de quantification est de 1 ng/mL pour le fipronil et pour le fipronil sulfone.

Le fipronil sulfone, principal métabolite du fipronil dans de nombreuses espèces animales, apparaît en même temps que le fipronil mais alors que la concentration en fipronil décroît, les concentrations de son métabolite augmentent fortement pendant les 3 premières heures. Ensuite, la vitesse d'élimination du fipronil sulfone dépasse sa vitesse de formation et la concentration du métabolite décroît mais beaucoup plus lentement que celle du fipronil puisque le temps de demi-vie moyen du fipronil sulfone est de 204 heures (Figure 19).

II.2.2. Détermination d'un schéma posologique chez le mouton

L'objectif est de déterminer chez le mouton le schéma posologique qui permet d'obtenir chez ce dernier la même exposition au fipronil que celle obtenue chez le rat par voie orale et associée à une modification de la sécrétion de TSH. Les paramètres pharmacocinétiques du fipronil chez le mouton déterminés précédemment (Cf. II.2.1.1.) sont utilisés pour déterminer la dose et la fréquence d'administration du fipronil.

La dose à injecter est donnée par l'équation :

$$\text{dose} / \tau = \text{Cl} \times C_{\text{moyenne}} \quad (\text{équation 14})$$

τ est l' intervalle entre chaque administration, Cl est le clairance du fipronil et C_{moyenne} est la concentration moyenne à l'équilibre

La clairance du fipronil est estimée à 427 mL/h/kg chez la brebis. La concentration moyenne est égale à la concentration plasmatique moyenne observée chez le rat exposé par voie orale quotidiennement à 30 mg/kg d'aliment de fipronil, sa valeur est de 50 ng/mL. Le calcul est fait sur la base d'une administration par jour donc τ est égal à 24 heures. Ainsi la dose à administrer par voie intra-veineuse, à 24 heures d'intervalle, pour obtenir, dans les conditions d'équilibre, une exposition égale à celle obtenue chez les rats exposés au fipronil, est de 0,512 mg/kg. L'administration quotidienne de cette dose pendant une durée équivalente à 3 à 4 fois le temps de demi-vie du fipronil, soit pendant 5 jours, doit conduire à une concentration plasmatique moyenne de fipronil de 50 ng/mL (Figure 20).

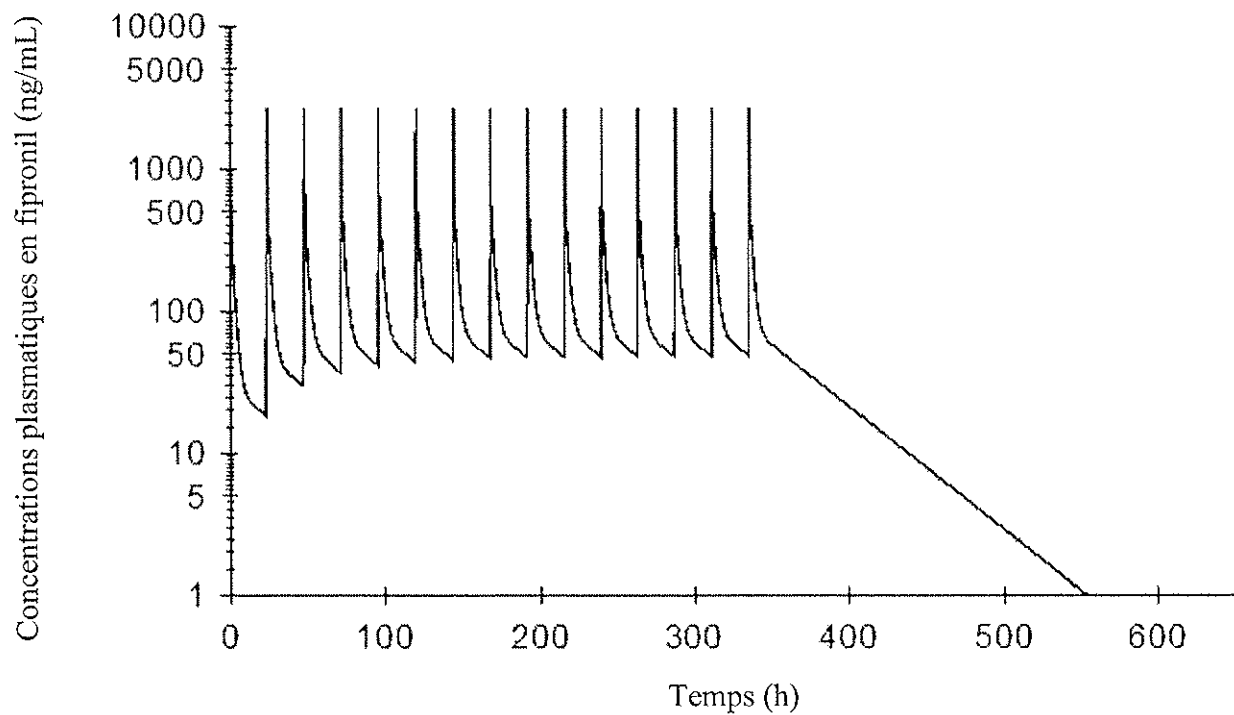


Figure 20 : Simulation de l'évolution des concentrations plasmatiques en fipronil (ng/mL) pour une administration quotidienne de 0,5 mg/kg de fipronil par voie intra-veineuse, chez le mouton.

Troisième partie : Discussion

L'objectif de cette étude était de développer un modèle animal qui serait plus pertinent que le rat, chez qui la TBG est inconstante, pour l'étude des effets des perturbateurs endocriniens sur la thyroïde. Le nouveau modèle d'étude que nous proposons est le modèle ovin. Or, pour pouvoir mettre en parallèle les effets thyroïdiens d'une exposition au fipronil chez le rat et chez le mouton, il faut s'assurer que les variations observées ne sont pas dues à des différences d'exposition ou de métabolisme du fipronil entre ces deux espèces. Il faut donc parvenir à reproduire chez le mouton, le même niveau d'exposition au fipronil que celui inducteur de perturbations thyroïdiennes chez les rats. Les résultats de notre étude qui a reproduit une exposition au fipronil inductrice de perturbations thyroïdiennes chez le rat, sur la base d'une administration quotidienne de 30 mg de fipronil par kilogramme d'aliment et par voie orale, indiquent que l'exposition est de l'ordre de 50 ng/mL de plasma. Afin de déterminer la dose de fipronil à administrer à la brebis pour obtenir une concentration plasmatique moyenne de 50 ng/mL, nous avons évalué les paramètres pharmacocinétiques du fipronil chez la brebis. Pour ce faire, nous avons suivi l'évolution des concentrations plasmatiques de fipronil chez le mouton, après une injection de 1mg/kg de fipronil par voie intra-veineuse. Nous avons ainsi évalué les paramètres pharmacocinétiques du fipronil et du fipronil sulfone. Nous avons ensuite déterminé un schéma posologique chez le mouton, qui permet d'obtenir des aires sous la courbe de 0 à 24 heures ($AUC_{(0-24h)}$) similaires chez le rat mis en contact avec le fipronil par voie orale et chez le mouton chez qui le fipronil est injecté en IV. Ainsi, d'après notre étude, chez le mouton, il faudrait injecter quotidiennement 0,512 mg/kg de fipronil par voie intraveineuse pour reproduire cette exposition.

Nos résultats suggèrent que les voies métaboliques du fipronil chez le mouton sont similaires à celles du rat. En effet, chez le rat traité par voie orale à hauteur de 30 mg de fipronil par kg d'aliment et pendant 4 semaines, on obtient un rapport de l'aire sous la courbe de 0 à 24 heures ($AUC_{(0-24h)}$) du fipronil sulfone par rapport à l'aire sous la courbe de 0 à 24 heures ($AUC_{(0-24h)}$) du fipronil qui est de 46,7. Chez le mouton auquel on a administré un bolus intra-veineux de fipronil (1 mg/kg), le rapport de l'aire sous la courbe de 0 à l'infini ($AUC_{(0-\infty)}$) du fipronil sulfone par rapport à l'aire sous la courbe de 0 à l'infini ($AUC_{(0-\infty)}$) du fipronil est de 18,7. Ces deux rapports sont du même ordre de grandeur ce qui indique que la transformation du fipronil en fipronil sulfone est une voie métabolique majeure dans ces deux espèces et que les expositions au fipronil sulfone dans ces deux espèces sont proches. Le

sulfone est donc le principal métabolite chez le mouton et chez le rat comme dans d'autres espèces telles que la chèvre, la poule et le chien (AFSSA, www.afssa.fr/ftp/afssa/basedoc/Rapportfipro.pdf, mars 2005).

Récemment les ministres de l'agriculture, de la santé, de la consommation et de l'environnement ont saisi l'AFSSA (Agence Française pour la Sécurité Sanitaire des Aliments) et l'AFSSE (Agence Française pour la Sécurité Sanitaire Environnementale) afin d'examiner les incertitudes scientifiques sur les risques pour la santé humaine pouvant résulter de l'exposition au fipronil (AFSSA, www.afssa.fr/ftp/afssa/basedoc/Rapportfipro.pdf, mars 2005). Ce groupe d'experts a présenté différents scénarios d'évaluation de l'exposition humaine au fipronil et à ses métabolites, basés sur un niveau de contamination des aliments proche des LMR (limite maximale de résidus) réglementaires. Selon les scénarios, l'exposition d'adultes via l'alimentation pourrait atteindre 18 à 100% des doses journalières admissibles ($0.2 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$). Chez l'enfant de moins de 18 mois, dans le scénario correspondant aux usages autorisés avant 2004, l'apport journalier maximum théorique pourrait avoir atteint plus de 800% de la DJA, l'apport estimé sur la base des STMR (concentrations médianes de résidus en essais contrôlés) avoisinerait les 400 % de la DJA. Il s'agit là de scénarios basés sur des hypothèses maximalistes en terme de résidus et de consommation. Ce groupe de travail a souligné l'insuffisance des données actuelles et la nécessité d'obtenir des données expérimentales pour pouvoir réaliser une estimation précise de l'exposition humaine, notamment dans des populations à risques. L'évaluation de l'exposition professionnelle de l'homme au fipronil révèle qu'elle est beaucoup plus importante que l'exposition via l'alimentation. Elle varie de 100% à 1700% des doses journalières admissibles. Le chiffre maximal obtenu dans le cadre de l'exposition professionnelle de toiletteurs à des produits vétérinaires à base de fipronil est de $3,4 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$ (AFSSA, www.afssa.fr/ftp/afssa/basedoc/Rapportfipro.pdf, 2005). Dans notre étude, l'exposition au fipronil qui correspond à la dose pour laquelle on observe des perturbations thyroïdiennes chez le rat, est approximativement de $50 \text{ ng}/\text{mL}$ de plasma. Pour reproduire cette exposition, il faut injecter chez le mouton $512 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$ de fipronil. Cette dose est donc beaucoup plus élevée que les doses de fipronil avec lesquelles l'homme serait en contact d'après les évaluations toxicologiques, même dans des situations critiques. Cependant, notre étude repose sur une exposition à court terme (28 jours), alors que l'exposition chez l'homme concerne le long terme (plusieurs semaines). Une fois le modèle ovin validé, pour une exposition à court terme et pour des effets sur la fonction thyroïdienne à court terme, il serait intéressant d'exposer le mouton au fipronil sur une durée plus longue et à des niveaux

d'exposition inférieurs, similaires à ceux présentés dans les évaluations toxicologiques sur l'exposition de l'homme au fipronil.

Une différence de physiologie thyroïdienne entre le rat et l'homme sert d'argument dans certaines études toxicologiques pour rejeter les résultats concernant les perturbations thyroïdiennes chez le rat lors d'expositions répétées au fipronil. En effet, le rat adulte n'a pas de TBG (Thyroxin Binding Globulin) entre 2 et 7 mois pour assurer le transport de ses hormones thyroïdiennes plasmatiques (Savu et al., 1991). Or l'absence de TBG diminue le temps de résidence des hormones thyroïdiennes même si l'exposition globale (AUC_{free}) reste la même. La diminution du temps de résidence peut avoir des conséquences si l'action des hormones thyroïdiennes est de type temps-dépendant et exige des concentrations seuils minimales pendant une durée donnée pour agir. La diminution du temps de résidence oblige en effet le rat à produire plus d'hormones pour garantir leur durée d'action (Toutain, 2004). Le taux de renouvellement des hormones thyroïdiennes est donc plus important chez le rat et la glande thyroïde est beaucoup plus sollicitée que dans les autres espèces. L'homme, au contraire, possède une TBG et cette protéine a un rôle majeur dans le transport des hormones thyroïdiennes plasmatiques et dans le maintien de l'homéostasie de la fonction thyroïdienne. Le mouton, lui, possède une TBG dont l'expression n'est pas régulée en fonction de l'âge, et une étude récente réalisée dans le cadre de l'UMR 181, portant sur l'importance de la liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines plasmatiques dans le maintien de l'homéostasie de la fonction thyroïdienne, suggère que la TBG ovine présente des propriétés pharmacologiques (affinité pour des anti-inflammatoires non stéroïdiens notamment) similaires à celles de la TBG humaine. Par exemple, la constante de dissociation à l'équilibre de la T4, soit la concentration pour laquelle on obtient 50% de la saturation, pour la TBG est de 0.09 ng/mL et de 0.016 ng/mL chez l'homme (Sutherland et al., 1975) et chez le mouton respectivement (Law-So, 2005).

Nos résultats n'ont pas mis en évidence, chez le rat, de différences des concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes entre les lots traités au fipronil et les lots contrôles contrairement à ce qui est décrit dans les dossiers d'évaluations toxicologiques du fipronil (AFSSA, www.afssa.fr/ftp/afssa/basedoc/Rapportfipro.pdf, mars 2005). Selon ces données, lors de traitement au fipronil de rats mâles, par voie orale, une diminution des concentrations plasmatiques de T3 a été observée au 7^{ème} jour de traitement, pour des aliments contenant 1mg/kg, 5mg/kg et 30mg/kg de fipronil (ce qui correspond à des doses ingérées de 0,1 ; 0,5 et 2,8 mg/kg/j, respectivement) mais, aucune diminution de la T3 n'a été observée au 28^{ème} jour. Dans les mêmes conditions chez les rats mâles, une diminution de la T4 au 7^{ème} jour de

traitement est notée pour des aliments contenant 5mg/kg et 30mg/kg de fipronil, cette diminution est également présente au 28^{ème} jour mais seulement chez les rats nourris avec de l'aliment contenant 30mg/kg de fipronil. Lors de traitement au fipronil de rats femelles, par voie orale, une augmentation de la T3 au 28^{ème} jour de traitement est observée chez les rats nourris avec un aliment qui contient 30 mg/kg de fipronil. Une diminution significative mais faible des concentrations plasmatiques de T4 est observée au 7^{ème} jour de traitement uniquement, lorsque l'aliment contient 30 mg/kg de fipronil. Cependant, il est à noter que même dans ces études les variations observées par rapport aux contrôles contemporains, sont limitées et ambiguës (diminution de la T3 chez les mâles au 7^{ème} jour mais pas au 28^{ème} jour ; augmentation de T3 chez les femelles, variation similaire des concentrations au cours du temps).

Dans notre étude, les concentrations plasmatiques d'hormones thyroïdiennes mesurées chez le rat sont approximativement de l'ordre de 3 à 4 fois celles de la littérature (Vansell et al., 2002). Les concentrations élevées en hormones thyroïdiennes de notre étude ont été observées conjointement à des valeurs de TSH similaires aux valeurs « normales » (Vansell et al., 2002). Ainsi, ceci serait en faveur d'une cause périphérique et non centrale de l'augmentation des concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes. Une cause périphérique d'augmentation de ces concentrations plasmatiques pourrait être l'anesthésie des rats préalable au prélèvement sanguin. En effet, l'anesthésie a été réalisée avec un mélange de xylazine et de kétamine (phénylcyclidine). La xylazine est un $\alpha 2$ -agoniste et la kétamine est un gaba-agoniste ainsi qu'un antagoniste de tous les neurotransmetteurs excitateurs (dopamine, sérotonine, noradrénaline, N-méthyl-D-aspartate). Or, la thyroïde possède une innervation sympathique et la stimulation de certains de ses récepteurs adrénergiques entraînerait la sécrétion d'hormones thyroïdiennes (Melander et al., 1978). Une autre cause d'élévation des concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes pourrait être le stress des animaux. En effet, du fait de l'inter-relation entre les fonctions corticotropes et thyrotropes, il convient d'envisager le stress provoqué par la manipulation des rats comme facteur d'élévation de la sécrétion d'hormones thyroïdiennes (Döhler et al., 1979). Cependant les rats ont bénéficié d'une période d'habituation durant laquelle ils ont été quotidiennement manipulés et on peut donc considérer que la manipulation des rats n'est probablement pas la cause de l'augmentation des concentrations plasmatiques d'hormones thyroïdiennes. Quelle que soit la cause de l'augmentation des valeurs des concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes dans notre étude, il est à noter que des stimulations artificielles aurait pu masquer des différences de concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes existantes

et liées au traitement, cependant l'absence d'effet du traitement sur les concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes pourrait également refléter des facteurs physiologiques internes. En effet, les rats utilisés avaient 6 mois ce qui est en limite de l'âge de réexpression de la TBG (Savu et al., 1991). Il est donc possible que les rats utilisés dans notre étude aient présenté des concentrations actives en TBG, les rendant en ce sens similaires à un modèle d'étude ovin. Ceci aurait pu influencer les concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes, car en présence de TBG, la thyroïde a moins besoin de synthétiser des hormones thyroïdiennes puisque leur temps de résidence est augmenté, et donc le système thyroïdien est globalement moins sensible aux perturbations. Dans notre étude, le traitement des rats au fipronil, à hauteur de 30 mg de fipronil par kg d'aliment et par jour, pendant 28 jours (soit une exposition alimentaire d'environ 1,3 mg/kg/j), entraîne une augmentation des concentrations plasmatiques de TSH qui sont multipliées par 1,6 par rapport aux animaux contrôles contemporains. Ceci est similaire aux données de la littérature qui obtiennent chez des rats traités avec 30 mg de fipronil par kg d'aliment par jour, pendant 28 jours, des valeurs de TSH de 1,8 et 2,2 fois celles des contrôles, pour les femelles et les mâles respectivement (AFSSA, www.afssa.fr/ftp/afssa/basedoc/Rapportfipro.pdf, 2005). Un des mécanismes principaux proposés au cours des études toxicologiques pour expliquer l'élévation de la concentration plasmatique de TSH est l'induction par le fipronil des enzymes hépatiques en charge de la métabolisation des hormones thyroïdiennes. En accord avec cette hypothèse, des travaux réalisés *in vitro* sur des systèmes microsomaux hépatiques ont en effet montré qu'en présence de fipronil, l'activité de ces enzymes hépatiques, notamment CYP13A et CYP2C19 (Tang et al., 2004), augmenterait et entraînerait une sur-métabolisation des hormones thyroïdiennes. Les résultats seraient donc compatibles avec l'hypothèse. Une autre voie d'action possible, non explorée pour le fipronil, mais démontrée pour des molécules perturbatrices thyroïdiennes telles que les PCB, se traduirait par l'induction par différentes molécules chimiques, des UGT (Uridine-Glucurono-Transférases) qui sont des enzymes hépatiques clés dans le métabolisme des hormones thyroïdiennes. Cependant, si un tel mécanisme existe, les T4-UGT seules, ne suffiraient pas à produire une élévation des concentrations plasmatiques de TSH chez le rat : l'activation de T3-UGT et donc la diminution des concentrations plasmatiques en T3 serait nécessaire pour entraîner l'élévation des taux de TSH (Vansell et al., 2001). Ces mécanismes provoqueraient une diminution des concentrations plasmatiques en hormones et par conséquent le rétrocontrôle négatif qu'elles exercent diminuerait aussi, induisant une augmentation de la sécrétion de TSH. Il est à noter que dans notre étude, l'augmentation de TSH est observée sans effet significatif sur les

concentrations en hormones thyroïdiennes. Des mécanismes compensateurs de l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien ont pu masquer une altération de la sécrétion des hormones thyroïdiennes. Alternativement, d'autres voies d'activation de la sécrétion de TSH, indépendantes d'un effet sur la clairance métabolique des hormones thyroïdiennes peuvent être envisagées.

Par exemple, la fixation du fipronil et/ou de ses métabolites sur les récepteurs GABA du système nerveux central représente un mécanisme qui pourrait expliquer une élévation des concentrations plasmatiques de TSH. Les effets antagonistes GABAergiques du fipronil au niveau du système nerveux central pourraient conduire à une suppression du tonus GABAergique inhibiteur de la sécrétion de TRH. En effet, non seulement il existe une innervation GABAergique des neurones à TRH (Feteke et al., 2002), mais en plus les agonistes GABA provoquent une inhibition de la sécrétion de TSH (Jarvinen et al., 1992). Ce dernier mécanisme d'action reste peu probable pour le fipronil lui-même car son affinité pour les récepteurs GABA des mammifères est faible et il faudrait des doses énormes de fipronil pour observer des effets centraux chez les mammifères. En revanche, les métabolites du fipronil sont beaucoup moins sélectifs vis-à-vis des récepteurs GABA des invertébrés (Hainzl et al., 1998). Chez le rat, le chien, la chèvre et la poule, le métabolite majoritaire du fipronil est le fipronil sulfone (AFSSA, www.afssa.fr/ftp/afssa/basedoc/Rapportfipro.pdf, 2005). Le fipronil sulfone agit, comme le fipronil sur les récepteurs GABA. Cependant, il est 6 fois plus sélectif pour les récepteurs GABA des vertébrés que le fipronil, le rapport des concentrations inhibant 50% de la liaison au récepteur GABA, du fipronil par rapport au fipronil sulfone, est de 6 (Hainzl et al., 1998). L'action du fipronil sulfone n'est donc pas à négliger. Ce métabolite a en effet été produit en grande quantité chez les rats exposés au fipronil et son temps de demi-vie est 6 fois supérieur à celui du fipronil chez le mouton. Chez les ovins comme chez le rat, nous avons montré que l'exposition au fipronil sulfone est 20 à 40 fois supérieure à l'exposition au fipronil. Le fipronil sulfone est donc plus impliqué que le fipronil lui-même.

Conclusion

De nos jours, l'intérêt scientifique et sociétal pour les perturbateurs endocriniens ne cesse d'augmenter. Toutes les substances soumises à autorisation font l'objet d'évaluations toxicologiques réglementaires, qui reposent sur des études expérimentales ayant lieu principalement chez le rat.

Cependant, le rat n'est pas un modèle pertinent pour l'étude de la toxicité thyroïdienne du fipronil car il ne permet pas d'extrapoler les résultats à l'homme du fait de l'absence de TBG. Nous proposons de développer un modèle ovin, plus pertinent par rapport à l'homme en matière de physiologie thyroïdienne.

Cette étude a permis par une approche pharmacocinétique, de déterminer un schéma posologique du fipronil chez le mouton qui mime une exposition similaire à celle des rats dans les conditions où on observe des perturbations thyroïdiennes. La détermination de ce schéma posologique rend le modèle ovin pertinent en terme d'exposition par rapport au modèle rat car les effets du fipronil qui seraient observés à ce niveau d'exposition chez l'ovin seraient dus à des variations de physiologie thyroïdienne et non à des différences de métabolisme du fipronil entre ces deux espèces.

Ainsi, ce schéma posologique du fipronil chez le mouton et les paramètres pharmacocinétiques du fipronil et du fipronil sulfone sur lesquels il est fondé, serviront dans des études toxicologiques ultérieures.

Enfin, l'étude qui reproduit l'exposition des rats au fipronil entraînant une augmentation des concentrations plasmatiques de TSH ne permet pas de conclure en ce qui concerne les hormones thyroïdiennes. Le mécanisme d'action du fipronil comme perturbateur thyroïdien pourrait ne pas reposer seulement sur l'activation des enzymes hépatiques responsables de la métabolisation des hormones thyroïdiennes. Une action centrale via les récepteurs GABA pourrait être mise en cause.

La validation de ce modèle permettra de l'utiliser ultérieurement pour évaluer les effets de l'exposition du mouton au fipronil, dans un contexte d'exposition chronique de long terme, reproduisant l'exposition de l'homme.

Les résultats présentés dans ce travail donneront lieu à une communication lors du 10^{ème} congrès de l'*European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology*, à Turin, du 17 au 22 septembre 2006.

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, A. MILON, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que

Mlle COCHARD Noémie

a été admis(e) sur concours en : 2001

a obtenu son certificat de fin de scolarité le : **08 JUIN 2006**

n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

Je soussignée, V. GAYRARD-TROY, Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
autorise la soutenance de la thèse de :


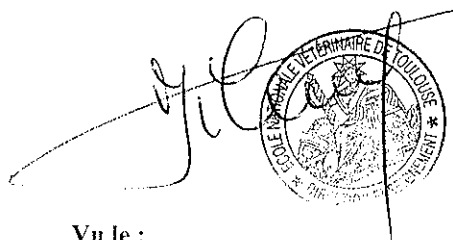
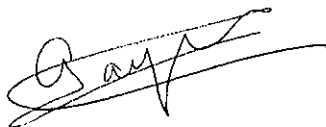
Mlle COCHARD Noémie

intitulée :

«Pertinence du modèle ovin par rapport au modèle rat pour l'étude de la toxicité thyroïdienne du Fipronil.»

Le Professeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Docteur Véronique GAYRARD-TROY

Vu :
Le Directeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON



Vu :
Le Président de la thèse :
Professeur Jean-Marc SOULAT

Vu le :
Le Président **12 JUIN 2006**
de l'Université Paul Sabatier
Professeur Jean-François SAUTEREAU



Bibliographie

AFSSA. Evaluation des risques pour la santé humaine liés à l'exposition au fipronil, [en ligne]. Adresse URL : <http://www.afssa.fr/ftp/afssa/basedoc/Rapportfipro.pdf>. mars 2005.

BROWN, V.

Disrupting a delicate balance, environmental effects on the thyroid.

Environmental Health Perspectives, Sept 2003, **111**, 12, 642-649

DOHLER, K.D., WONG, C.C., VON ZUR MUHLEN, A.

The rat as model for the study of drug effects on thyroid function: Consideration of methodological problems.

Pharmacology and Therapeutics, 1979, **5**, 305-318

FETEKE, C., WITTMANN, G., LIPOSITS, Z., LECHAN, R.M.

Gabaergic innervation of thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat.

Brain Research, 2002, **957**, 251-258

FONNUM, F.

Neurotoxicology.

In : General and applied toxicology, volume 2. 2nd edition.

New-York : Grove's dictionaries inc., 1999, 640-641

GOLDEY, E.S., KEHN, L.S., LAU, C., REHNBERG, G.L., CROFTON, K.M.

Developmental exposure to polychlorinated biphenyls (aroclor 1254) reduces circulating thyroid hormone concentrations and causes deficits in rats.

Toxicology and applied pharmacology, 1995, **135**, 77-88

HAINZL, D., CASIDA, J.E.

Fipronil insecticide : Novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1996, **93**, 12764-12767

HAINZL, D., COLE, L.M., CASIDA, J.E.

Mechanisms for selective toxicity of fipronil insecticide and its sulfone metabolite and desulfinyl photoproduct.

Chemical Research in Toxicology, 1998, **11**, 1529-1535

HURLEY, P.M., HILL, R.N., WHITING, R.J.

Mode of carcinogenic action of pesticides inducing thyroid follicular cell tumors in rodents.

Environmental Health Perspectives, 1998, **106**, 437-445

INRA, site de l'institut national de recherche agronomique, [en ligne].

Adresse URL : <http://www.inra.fr/agritox>

JARVINEN, A., RAGO, L., MANNISTO, P.T.

Effects of central and peripheral type benzodiazepine ligands on thyrotropin and prolactin secretion.

Neuropeptides, 1992, **21**, 3, 183-191

JORDAN, D., PONCET, C., VEISSEIRE, M., MORNEX, R.
Role of GABA in the control of thyrotropin secretion in the rat.
Brain research, 1983, **268**, 1, 105-110

KANEKO, J.J.
Thyroid function.
In: *Clinical biochemistry of domestic animals*, 5th edition
San Diego: Academic press, 1997, 571-588

KATO, Y., IKUSHIRO, S., HARAGUCHI, K., YAMAZAKI, T., ITO, Y., SUZUKI, H.,
KIMURA, R., YAMADA, S., INOUE, T., DEGAWA, M.
A possible mechanism for decrease in serum thyroxine level by polychlorinated biphenyls in
Wistar and Gunn rats.
Toxicological sciences, 2004, **81**, 309-315

LABAUNE, J.P.
Synthèse.
In: *Pharmacocinétique, principes fondamentaux*, 2nde édition
Paris : Masson, 1988, 274-278

LARSEN, P.R., WILSON, J.D., FOSTER, D.W., KRONENBERG, H.M.
Thyroid.
In : *Williams textbook of endocrinology*.
USA: WB Saunders company, 1998, 389-515

LARSSON, M., PETTERSSON, T., CARLSTRÖM, A.
Thyroid hormone binding in serum of 15 vertebrate species: isolation of thyroxine-binding
globulin and prealbumin analogs.
General and comparative endocrinology, 1985, **58**, 360-375

LAW-SO, G.
Importance de la liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines de plasmatiques dans le
maintien de l'homéostasie de la fonction thyroïdienne.
Rapport de DEA, UMR 181- Physiopathologie et toxicologie expérimentales- INRA/ENVT,
2005.

McCLAIN, R.M.
Mechanistic considerations for the relevance of animal data on thyroid neoplasia to human
risk assessment.
Mutation research, 1995, **333**, 131-142

MELANDER, A., LJUNGGREN, J.G., NORBERG, K.A., PERSSON, B., ROSENGREN, E.,
SUNDLER, F., TIBBLIN, S., WESTGREN, U.
Sympathetic innervation and noradrenaline content of normal human thyroid tissue from fetal,
young, and elderly subjects.
Journal of Endocrinological Investigation, 1978, **1**, 2, 175-177

RATRA, G.S., KAMITA, G., CASIDA, J.E.
Role of human GABA_A receptor β 3 subunit in insecticide toxicity.
Toxicology and applied pharmacology, 2001, **172**, 233-240

- RATRA, G.S., CASIDA, J.E.
GABA receptor subunit composition relative to insecticide potency and selectivity.
Toxicology letters, 2001, **122**, 215-222
- RAUH, J.J., LUMMIS, S.C.R., SATTELLE, D.B.
Pharmacological and biochemical properties of insect GABA receptors.
Trends in Pharmacological sciences, 1990, **11**, 325-329
- REFETOFF, S., ROBIN, N.I., FANG, V.S.
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, 793-805
- RONDEEL, J.M., DE GREEF, W.J., KLOOTWIJK, W., VISSER, T.J.
Effects of hypothyroidism on hypothalamic release of thyrotropin-releasing hormone in rats.
Endocrinology, 1992, **130**, 2, 651-656
- SAVU, L., VRANCKX, R., ROUAZE-ROMET, M., MAYA, M., NUNEZ, E.A., TRETON, J., FKINK, I.L.
A senescence up-regulated protein : the rat thyroxin-binding globulin (TBG).
Biochimica et Biophysica Acta, 1991, **1097**, 19-22
- SUTHERLAND, R.L., SIMPSON-MORGAN, M.W.
Thyroxine-binding properties of serum proteins. A competitive binding technique employing sephadex G-25.
Journal of Endocrinology, 1975, **65**, 319-332
- TANG, J., USMANI, A., HODGSON, E., ROSE, R.L.
In vitro metabolism of fipronil by human and rat cytochrome P450 and its interactions with testosterone and diazepam.
Chemico-biological interactions, 2004, **147**, 319-329
- THOMAS, G.A., WILLIAMS, E.D.
Evidence for and possible mechanisms of non-genotoxic carcinogenesis in the rodent thyroid.
Mutation Research, 1991, **248**, 357-370
- THOMAS., J.A., THOMAS., M.J.
Thyroid gland.
In : General and applied toxicology, volume 2. 2nd edition.
New-York : Grove's dictionaries inc., 1999, 988-990
- TINGLE, C.C., ROTHER, J.A., DEWHURST, C.F., LAUER, S., KING, W.J.
Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns.
Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 2003, **176**, 1-66
- TOUTAIN, P.L.
Mémo sur le binding de la T3 et de la T4.
UMR 181- Physiopathologie et toxicologie expérimentales- INRA/ENVY, 2005, 1-12

USMANI, K.A., KAROLY, E.D., HODGSON, E., ROSE, R.L.

In vitro sulfoxydations of thioether compounds by human cytochrome P450 and flavin-containing monooxygenase isoforms with particular reference to the CYP2C subfamily.

Drug Metabolism and Disposition: the biological fate of chemicals, 2004, **32**, 3, 333-339

VANSELL, N.R., KLAASSEN, C.D.

Increase in rat liver UDP-glucuronosyltransferase mRNA by microsomal enzyme inducers that enhance thyroid hormone glucuronidation.

Drug Metabolism and Disposition: the biological fate of chemicals, 2002, **30**, 3, 240-246

VANSELL, N.R., KLAASSEN, C.D.

Effect of microsomal enzyme inducers on the biliary excretion of triiodothyronine (T(3)) and its metabolites.

Toxicological Sciences, 2002, **65**, 2, 184-191

VISSER, T.J., KAPTEIN, E., VAN TOOR, H., VAN RAAIJ, J.A.G.M., VAN DEN BERG, K.J., JOE, C.J.T., VAN ENGELEN, J.G.M., BROUWER, A.

Glucuronidation of thyroid hormone in rat liver : effects of in vivo treatment with microsomal enzyme inducers and in vitro assay conditions.

Endocrinology, 1993, **133**, 2177-2186

VISSER, T.J., KAPTEIN, E., VAN RAAIJ, J.A., JOE, C.T., EBNER, T., BURCHELL, B.

Multiple UDP-glucuronyltransferases for the glucuronidation of thyroid hormone with preference for 3,3',5'-triiodothyronine (reverse T3).

FEBS Letters, 1993, **315**, 1, 65-68

VRANCKX, R., ROUAZE-ROMET, M., SAVU, L., MECHIGHEL, P., MAYA, M., NUNEZ, E.A.

Regulation of rat thyroxine-binding globulin and transthyretin : studies in thyroidectomized and hypophysectomized rats given tri-iodothyronine or/and growth hormone.

Journal of endocrinology, 1994, **142**, 77-84

WILLIAMS, E.D.

Mechanisms and pathogenesis of thyroid cancer in animals and man.

Mutation research, 1995, **333**, 123-129

ZOELLER, R.T.

Challenges confronting risk analysis of potential thyroid toxicants

Risk analysis, 2003, **23**, 1, 143-161

ZOELLER, R.T., DOWLING, A.L.S., HERZIG, T.A., LANNACONE, E.A., GAUGER, K.J., BANSAL, R.

Thyroid hormone, Brain development, and the environment.

Environnemental Health Perspectives, June 2002, **110**, 3, 355-361

Toulouse, 2006

NOM : COCHARD

PRENOM : NOEMIE

TITRE : PERTINENCE DU MODELE OVIN PAR RAPPORT AU MODELE RAT POUR L'ETUDE DE LA TOXICITE THYROIDIENNE DU FIPRONIL.

RESUME :

L'augmentation inquiétante des cancers de la thyroïde, souvent liés à des dysendocrinies, justifie le développement de modèles d'étude toxicologique plus pertinents que le rat, par rapport à l'homme pour l'étude des perturbateurs thyroïdiens. Ce travail s'inscrit dans le cadre du développement du modèle ovin. Dans un premier temps nous avons déterminé chez le rat l'exposition à un perturbateur endocrinien potentiel, le fipronil, et à son principal métabolite, lors de traitement au fipronil inducteur de perturbations thyroïdiennes. Dans notre étude, une élévation des concentrations plasmatiques de TSH est observée à ce niveau d'exposition. Dans un deuxième temps, nous avons évalué les principaux paramètres pharmacocinétiques du fipronil dans l'espèce ovine. Ces paramètres ont été utilisés pour déterminer un schéma posologique capable de mimer chez les ovins l'exposition au fipronil inductrice de perturbations thyroïdiennes chez le rat.

MOTS-CLES :

THYROIDE / ENDOCRINOLOGIE / PESTICIDE / OVIN / RAT / TOXICITE / FIPRONIL / TROUBLES ENDOCRINIENS

ENGLISH TITLE : RELEVANCE OF THE OVINE MODEL COMPARED WITH THE RAT MODEL FOR THE STUDY OF FIPRONIL THYROID TOXICITY.

ABSTRACT :

The worrying increase of thyroid cancers, often linked to dysendocrinia, justifies the development of models for toxicological studies, more relevant than rat in comparison with man, for the study of thyroid disruptors. This project aimed at developing the ovine model. First, we determined the exposure to a potential thyroid disruptor, the fipronil and to his principal metabolite in rat, with a treatment described as being inductor of thyroid disruptions. In our study, an increase in TSH serum levels is observed at that level of exposure. Then, we evaluated the main pharmacokinetic parameters of fipronil in the ovine species. These parameters have been used to determine a dosage regimen able to mime in ovines the exposure to fipronil that induce thyroid disruption in rats

KEY WORDS :

THYROID / ENDOCRINOLOGY / PESTICIDE / OVINE / RAT / TOXICITY / FIPRONIL / ENDOCRINE DISRUPTS

