



ANNEE 2009 THESE : 2009 – TOU 3 – 4077

EVALUATION DE L'ALTERATION DE LA FONCTION THYROÏDIENNE PAR LES POLYBROMODIPHENYLE ETHERS CHEZ LE MOUTON

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2009
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse
par*

Nathalie RAUZET
Née le 10 juin 1984 à Périgueux

Directeur de thèse : Mme le Docteur Nicole HAGEN-PICARD

JURY

PRESIDENT :
M. Philippe CARON

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :
Mme Nicole HAGEN-PICARD
Mme Véronique GAYRARD-TROY

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :
Mme Catherine VIGUIE

Docteur vétérinaire





Enseignement agricole
Formations grandeur nature



Ministère de l'Agriculture et de la Pêche
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur : M. A. MILON

Directeurs honoraires M. G. VAN HAVERBEKE.
M. P. DESNOYERS

Professeurs honoraires :

M. L. FALIU M. J. CHANTAL M. BODIN ROZAT DE MENDRES NEGRE
M. C. LABIE M. JF. GUELFY
M. C. PAVAU M. EECKHOUTTE
M. F. LESCURE M. D.GRIESS
M. A. RICO M. CABANIE
M. A. CAZIEUX M. DARRE
Mme V. BURGAT M. HENROTEAUX

PROFESSEURS CLASSE
EXCEPTIONNELLE

M. BRAUN Jean-Pierre, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. DORCHIES Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. EUZEBY Jean, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. TOUTAIN Pierre-Louis, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 1°
CLASSE

M. AUTEFAGE André, *Pathologie chirurgicale*
Mme CLAUW Martine, *Pharmacie-Toxicologie*
M. CORPET Denis, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
M DELVERDIER Maxence, *Anatomie Pathologique*
M. ENJALBERT Francis, *Alimentation*
M. FRANCO Michel, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. MARTINEAU Guy, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
M. PETIT Claude, *Pharmacie et Toxicologie*
M. REGNIER Alain, *Physiopathologie oculaire*
M. SAUTET Jean, *Anatomie*
M. SCHELCHER François, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 2°
CLASSE

Mme BENARD Geneviève, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. BERTHELOT Xavier, *Pathologie de la Reproduction*
M. BOUSQUET-MELOU Alain, *Pharmacologie et Thérapeutique*
M. CONCORDET Didier, *Mathématiques, Statistique, Modélisation*
M. DUCOS Alain, *Zootéchnie*
M. DUCOS DE LAHITTE Jacques, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
Mme GAYRARD-TROY Véronique, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. GUERRE Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme HAGEN-PICARD Nicole, *Pathologie de la Reproduction*
M. LEFEBVRE Hervé, *Physiologie et Thérapeutique*
M. LIGNEREUX Yves, *Anatomie*
M. PICAUVET Dominique, *Pathologie infectieuse*
M. SANS Pierre, *Productions animales*
Mme TRUMEL Catherine, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

**INGENIEUR DE
RECHERCHE**

- M. TAMZALI Youssef, *Responsable Clinique Equine*
M. REYNOLDS Brice, *Médecine, Ophtalmologie*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

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

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

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

**MAITRES DE CONFERENCES (classe
normale)**

- M. ASIMUS Erik, *Pathologie chirurgicale*
M. BAILLY Jean-Denis, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme BENNIS-BRET Lydie, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. BERGONIER Dominique, *Pathologie de la Reproduction*
M. BERTAGNOLI Stéphane, *Pathologie infectieuse*
Mme BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mlle BOULLIER Séverine, *Immunologie générale et médicale*
Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. BRUGERE Hubert, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mlle CADIERGUES Marie-Christine, *Dermatologie*
M. CORBIERE Fabien, *Pathologie des ruminants*
Mlle DIQUELOU Armelle, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. DOSSIN Olivier, (DISPONIBILITE) *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. FOUCRAS Gilles, *Pathologie du Bétail*
M. GUERIN Jean-Luc, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*
M. JACQUIET Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. JAEG Jean-Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*
Mlle LACROUX Caroline, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
M. LYAZRHI Faouzi, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. MATHON Didier, *Pathologie chirurgicale*
M MEYER Gilles, *Pathologie des ruminants.*
Mme MEYNAUD-COLLARD Patricia, *Pathologie Chirurgicale*
M. MOGICATO Giovanni, *Anatomie, Imagerie médicale*
M. MONNEREAU Laurent, *Anatomie, Embryologie*
Mlle PALIERNE Sophie, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme PRIYENKO Nathalie, *Alimentation*
Mme LETRON-RAYMOND Isabelle, *Anatomie pathologique*
Mme TROGELER-MEYNADIER Annabelle, *Alimentation*
M. VOLMER Romain, *Microbiologie et Infectiologie*
M. VERWAERDE Patrick, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES CONTRACTUEL

- Mlle BUCK-ROUCH, *Médecine interne des animaux de compagnie*
M. CASSARD Hervé, *Pathologie du bétail*
M. DOUET Jean-Yves, *Ophtalmologie*
M. SEQUELA Jérôme, *Médecine interne des animaux de compagnie*
M. VERSET Michaël, *Chirurgie des animaux de compagnie*

**ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
CONTRACTUELS**

- Mlle BIBBAL Delphine, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. CONCHOU Fabrice, *Imagerie médicale*
M. GIN Thomas, *Production et pathologie porcine*
M. LIENARD Emmanuel, *Parasitologie et maladies parasitaires*
M. NOUVEL Laurent, *Pathologie de la reproduction*
M. RABOISSON Didier, *Productions animales*
Mlle TREVENNEC Karen, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*

Remerciements

Aux membres du jury de thèse,

A Monsieur le Professeur Philippe CARON

Professeur des Universités
Praticien hospitalier
Endocrinologie

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse.
Hommage respectueux.

A Madame le Professeur Nicole Hagen-Picard

Professeur Vétérinaire de TOULOUSE
Pathologie de la reproduction

Qui m'a guidé tout au long de l'élaboration de ce travail.
Pour sa disponibilité et ses précieux conseils.
Sincères remerciements.

A Madame le Docteur Véronique Gayrard-Troy

Professeur Vétérinaire de TOULOUSE
Physiologie de la reproduction

Qui a aimablement accepté de faire partie de mon jury de thèse.
Sincère reconnaissance.

A Madame le Docteur Catherine Viguié

Docteur Vétérinaire
Chargée de recherches UMR 181 INRA ENVT

Pour sa précieuse relecture.
Qu'elle soit assurée de ma gratitude.

A ma famille,

Virginie et Marie-Annick, merci de votre soutien quotidien, de votre compréhension et de votre réconfort notamment pendant les deux années de prépa. Je n'oublierai jamais un certain quai de gare... Je vous dois tout.

Nico, mon exemple, **Maman et Papa** : merci à vous trois pour tout votre amour.

Polo merci pour ta bonne humeur imperturbable.

Bernadette, Jacques, Bernard et Céline merci pour tant de joies et de rires partagés.

Mémé, j'aimerais tant être aussi forte que toi ! Merci pour ton éternelle bonté, je suis si fière d'être ta petite fille.

Françoise et René, merci pour vos encouragements qui me sont allés droit au cœur.

David et Ihanta, une grande pensée pour vous.

Alice merci pour tes conseils avisés...

Yvette, merci de m'avoir offert tant de tendresse et de chaleur.

Amandine, une heureuse nouvelle venue.

Betty et Minou, les deux soleils de mon enfance...

Jérôme, parce que les opposés s'attirent...tu es ma parfaite moitié...merci pour tout ce que tu m'apportes.

A mes amis,

Marie-Laure, à notre amitié si précieuse depuis la maternelle, à ton écoute attentive, à tous tes bons conseils,...à la belle époque du lycée...

Isabelle, Julie et Céline, mes trois chéries ! Merci d'être toujours là pour moi.

Thierry, merci d'avoir toujours cru en moi.

Xavier, Clément, Arnaud, Yannick, tendres pensées.

Ma Cassou, mon ange, merci pour ta gentillesse et ton sourire à toute épreuve. 1000 mercis pour tout, merci pour nos cafés, thés, apéros, dîners, massages, préchauffes, pré-préchauffes et autres !

Marion et Anne-Claire, 7 ans déjà ! Merci pour nos soirées en prépa, elles étaient rares mais intenses... ! Merci pour votre soutien pendant ces 7 années. A toutes nos soirées et à nos confidences...

Bibi, reste dans la lune, c'est comme ça qu'on t'aime !

PP, sacré DDF ! Merci pour tous ces fous rires ! T'es un mec en or...

Claire-Lyse, t'es un amour, ne change pas !

Canari, cher co-trinôme de T1, ça a été un réel plaisir de travailler avec toi !

Fanny, Amandine, Pauline, Guillaume, Béa, Marylou, Marion, Shyk, Clément, Cécile, Estelle, Val, merci pour tous ces bons moments partagés !

A Flo...

Table des matières

<i>Table des matières</i>	11
<i>Table des illustrations</i>	13
<i>Liste des abréviations</i>	16
Introduction	18
I. Matériel et méthodes	28
I.1. Animaux	28
I.2. Préparation des solutions à administrer	28
I.2.1. Solutions plasmatiques de penta-BDE, de déca-BDE et de plasma contrôle	28
I.2.2. Solution de T3	29
I.2.3. Solution de T4	29
I.3. Plan expérimental	29
I.3.1. Profils de concentration des hormones thyroïdiennes, de TSH et de cortisol	31
I.3.2. Administrations des PBDE et de plasma contrôle	31
I.3.3. Pharmacocinétique des PBDE	31
I.3.4. Exposition aux PBDE	31
I.3.5. Administration de T3 et validation du modèle	32
I.3.6. Pharmacocinétique de T4	32
I.3.7. Evaluation de l'effet des PBDE sur la liaison aux protéines plasmatiques	32
I.3.7.1. Etudes <i>in vitro</i>	32
I.3.7.2. Etudes <i>in vivo</i>	33
I.4. Procédures expérimentales	33
I.4.1. Thyroïdectomie et pesée des thyroïdes	33
I.4.2. Pesée des glandes surrénales et des hypophyses	34
I.4.3. Réalisation des prélèvements sanguins	34
I.4.4. Traitement des prélèvements sanguins	34
I.4.5. Méthodes de dosages	35
I.4.5.1. Dosage de la TSH	35
I.4.5.2. Dosages de T3, de T4 (libres et totales) et du cortisol	35
	11

I.4.6. Analyse pharmacocinétique de T4 (libre et totale)	36
I.4.7. Dialyse à l'équilibre	38
I.5. Analyses statistiques	40
II. Résultats	43
II.1. Effet des PBDE sur la TSH	43
II.2. Effet des PBDE sur la fonction thyroïdienne	44
II.2.1. Effet des PBDE sur les concentrations plasmatiques de T4 et de T3 (libres et totales)	44
II.2.2. Effet des PBDE sur le poids des thyroïdes	47
II.3. Effet des PBDE sur la fonction surrénalienne	47
II.4. Effet des PBDE sur la pharmacocinétique de T4 libre et totale	50
II.5. Effet des PBDE sur la liaison de T3 aux protéines plasmatiques	54
II.5.1. Etudes <i>in vitro</i>	54
II.5.2. Etudes <i>in vivo</i>	56
III. Discussion	61
Conclusion et perspectives	75
<i>Références bibliographiques</i>	77

Table des illustrations

Figures

Figure I : Formule chimique du penta-BDE	21
Figure II : Formule chimique du déca-BDE	21
Figure III : Formules chimiques de T4 et de T3	21
Figure IV : Principaux sites d'action des PBDE sur la fonction thyroïdienne	25
Figure V : Représentation schématique du plan expérimental	30
Figure VI : Schéma du modèle tricompartimental de la pharmacocinétique de la T4	37
Figure VII : Moyennes \pm ET des poids en gramme des hypophyses après 90 jours de traitement placebo ou PBDE à la dose de 100 ng/kg/j par voie IV	43
Figure VIII : Profil des concentrations de T4 libre (moyenne \pm ET) avant (symboles blancs) et après (symboles noirs) 28 jours de traitement placebo, déca-BDE et penta-BDE à la dose de 100 ng/kg/j par voie IV	45
Figure IX : Moyennes \pm ET des poids en gramme des thyroïdes après 28 à 32 jours de traitement placebo ou PBDE à la dose de 100 ng/kg/j par voie IV	47
Figure X : Profil des concentrations plasmatiques de cortisol (moyenne \pm ET) avant (symboles blancs) et après (symboles noirs) 28 jours de traitement placebo, déca-BDE et penta-BDE à la dose de 100 ng/kg/j par voie IV	48
Figure XI : Moyennes \pm ET des poids en gramme des glandes surrénales après 90 jours de traitement placebo ou PBDE à la dose de 100 ng/kg/j par voie IV	50
Figure XII : Evolution temporelle des concentrations de T4 totale de la brebis B1 traitée pendant 47 jours avec un plasma placebo et après administration de T4 à la dose de 10 μ g/kg par voie IV	51
Figure XIII : Evolution temporelle des concentrations moyennes (\pm ET) de T4 libre après une administration par voie IV à la dose de 10 μ g/kg de T4	52
Figure XIV : Evolution temporelle des concentrations moyennes (\pm ET) de T4 totale après une administration par voie IV à la dose de 10 μ g/kg de T4	53
Figure XV : Concentrations de T3 totale en fonction de concentrations plasmatiques croissantes de penta-BDE et de déca-BDE	55
Figure XVI : Concentrations de T3 libre en fonction de concentrations plasmatiques croissantes de penta-BDE et de déca-BDE – dosage radioimmunologique	55

Figure XVII : Moyennes \pm ET des concentrations de T3 libre en fonction de concentrations plasmatiques croissantes de penta-BDE et de déca-BDE – dosage par dialyse à l'équilibre 56

Figure XVIII : Concentrations de T3 liée aux protéines plasmatiques en fonction des concentrations de T3 libre des brebis B5 (témoin), B10 (déca-BDE) et B12 (penta-BDE) 58

Tableaux

Tableau I : Concentrations moyennes (ng/g de lipides) de tétra-BDE et de penta-BDE dans le sérum de Norvégiens en fonction de l'âge (2 sexes mélangés) 20

Tableau II : Fractions libres des hormones thyroïdiennes chez l'homme, le mouton et le rat 22

Tableau III : Pourcentage de T4 liée aux protéines plasmatiques chez différentes espèces 23

Tableau IV : Répétabilité et reproductibilité du dosage de la TSH pour 2 contrôles qualité (0,3 et 1,5 ng/mL) 35

Tableau V : Répétabilité et reproductibilité du dosage de T3 libre pour 3 contrôles qualité (0,3, 1,5 et 4 pg/mL) 35

Tableau VI : Répétabilité et reproductibilité du dosage de T3 totale pour 3 contrôles qualité (0,3, 1,5 et 2 ng/mL) 35

Tableau VII : Répétabilité et reproductibilité du dosage de T4 libre pour 3 contrôles qualité (10, 50 et 150 pg/mL) 36

Tableau VIII : Répétabilité et reproductibilité du dosage de T4 totale pour 3 contrôles qualité (10, 50 et 150 ng/mL) 36

Tableau IX : Répétabilité et reproductibilité du dosage du cortisol totale pour 3 contrôles qualité (15, 150 et 300 ng/mL) 36

Tableau X : Moyennes et rapports \pm ET des concentrations de T4 et de T3 (libres et totales) avant et après 28 jours de traitement placebo ou PBDE à la dose de 100 ng/kg/j par voie IV 46

Tableau XI : Moyennes et rapports \pm ET des concentrations du cortisol (ng/mL) avant et après 28 jours de traitement placebo ou PBDE à la dose de 100 ng/kg/j par voie IV 49

Tableau XII : Moyennes \pm ET des concentrations de T3 totale (ng/mL) avant et après thyroïdectomie et supplémentation en T3 à la dose de 3 μ g/kg/j 50

Tableau XIII : Paramètres pharmacocinétiques \pm ET de la T4 libre après une administration par voie IV à la dose de 10 μ g/kg de T4 53

Tableau XIV : Paramètres pharmacocinétiques \pm ET de la T4 totale après une administration par voie IV à la dose de 10 μ g/kg de T4	54
Tableau XV : Moyenne \pm ET des pourcentages de T3 libre avant et après 28 jours de traitement placebo ou PBDE	56
Tableau XVI : Moyennes \pm ET de la constante de dissociation à l'équilibre de TBG-T3 (ng/mL), de la capacité maximale de liaison de T3 à la TBG (ng/mL) et de la constante de liaison non spécifique de T3 à la TTR et à l'albumine avant et après 28 jours de traitement déca-BDE ou penta-BDE	57
Tableau XVII : Moyennes \pm ET de la constante de dissociation à l'équilibre de TBG-T3 (ng/mL), de la capacité maximale de liaison de T3 à la TBG (ng/mL) et de la constante de liaison non spécifique de T3 à la TTR et à l'albumine après 39-46 jours de traitement placebo ou PBDE à la dose de 100 ng/kg/j par voie IV	59
Tableau XVIII : Comparaison des clairances et des concentrations plasmatiques de T4 totale chez l'homme, la brebis et le rat	62
Tableau XIX : Comparaison des concentrations plasmatiques des hormones thyroïdiennes chez la brebis	65
Tableau XX : Effets des PBDE sur la fonction thyroïdienne des rongeurs selon différentes études	66
Tableau XXI : Comparaison des valeurs de la clairance de T4 (libre et totale) chez les ovins rapportées dans la littérature	70

Liste des abréviations

ANOVA : Analyse de variance
ATP : Adénosine Triphosphate
AUC : Aire sous la courbe
Bmax : Capacité maximale de liaison
Cl : Clairance plasmatique
Déca-BDE : Déca-Bromodiphényle Ether
DE-71 : mélange de PBDE majoritairement composé de penta-BDE et de tétra-BDE
DJA : Dose Journalière Admissible
DL₅₀ : Dose Létale pour 50% des individus
DMSO : DiMéthylSulfOxyde
dpm : désintégration par minute
ENVT : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
EROD : Ethoxyresorufin-O-Deethylase
ET : Ecart Type
IV : Intraveineuse
Kd : constante de dissociation à l'équilibre
LOQ : Limite de quantification
MRT : Temps moyen de résidence
n : nombre d'échantillons
NHPP : National Hormone and Pituitary Program
NOAEL : No Observable Adverse Effect Level : dose sans effet indésirable
NS : constante de liaison non spécifique
PBDE : Polybromodiphényle Ether
Penta-BDE : Penta-Bromodiphényle Ether
PK : Pharmacocinétique
PROD : Pentoxuresorufin-O-depentylase
SC : Sous cutanée
t_{1/2} : temps de demi-vie
T3 : L-triiodothyronine
T4 : L-tétraiodothyronine ou thyroxine
TBG : Thyroxin Binding Globulin
TRH : Thyrotropin Releasing Hormone
TSH : Thyroid Stimulating Hormone ou thyrotropine
TTR : Transthyrétine
UDPGT : Uridine Diphosphoglucuronosyl Transferase
UV : Ultraviolet
V_c : Volume de distribution du compartiment central
VO : Voie orale
V_{ss} : Steady State Volume of distribution : Volume de distribution à l'équilibre

Introduction

L'utilisation croissante de matériaux inflammables dans la fabrication des biens de consommation a amené les autorités à mettre en place des normes pour garantir la sécurité des consommateurs. En effet, les incendies représentent un problème humain et économique important. Par exemple aux Etats-Unis, les incendies tuent chaque année 3500 personnes et en blessent plus de 18000. Ils entraînent une perte économique annuelle de 10,7 billions de dollars (Karter, 2006). Aussi, pour prévenir les risques d'incendies, des substances chimiques appelées retardateurs de flamme, ont été utilisées de manière importante. Ils sont principalement représentés par les retardateurs de flamme bromés dont l'utilisation n'a cessé de croître depuis les années 1960 (Darnerud, 2001).

Les polybromodiphényle éthers (PBDE) représentent près du tiers de ces substances chimiques. Ils sont ignifuges c'est-à-dire qu'ils inhibent ou suppriment le processus de combustion par une action physique et/ou chimique. En effet, ces dérivés halogénés sont très efficaces dans le piégeage des espèces radicalaires formées lors de la combustion. Ils sont peu onéreux pour les industriels, c'est la raison pour laquelle on en retrouve dans tous les équipements domestiques et industriels comme les appareils audio-visuels, les matériaux de construction, les voitures mais aussi dans les textiles d'ameublement, les peintures et les plastiques. En 2001, la production mondiale de déca-BDE, le plus utilisé des PBDE, a été de 56100 tonnes et celle de penta-BDE de 7500 tonnes soit un total de 63600 tonnes (BSEF, 2008).

De nombreuses études ont montré que ces substances pouvaient être toxiques à fortes doses, elles peuvent présenter des effets perturbateurs endocriniens, notamment par rapport à la fonction thyroïdienne (Kuiper, 2008 ; Turyk, 2008 ; Tseng, 2007 ; Kuriyama, 2007 ; Fernie, 2005 ; Stoker, 2004 ; Tomy, 2004 ; Hallgren, 2002 ; Zhou, 2002 ; Meerts, 2000), c'est la raison pour laquelle des mesures d'interdiction du penta-BDE et d'autres PBDE moins bromés ont été prises dès 2004 au sein de l'Union Européenne. En 2008, elles ont été renforcées par une restriction de l'utilisation du déca-BDE (directive 2002/95/CE et arrêt du 1^{er} avril 2008). Compte tenu des enjeux économiques importants associés à l'utilisation des PBDE, l'évaluation du risque toxicologique présente des enjeux sociétaux, de protection de l'environnement et de santé publique.

Avant de présenter notre étude expérimentale sur les effets perturbateurs thyroïdiens des PBDE sur un modèle ovin, une première partie bibliographique fera le point sur les caractéristiques des PBDE et la contamination de l'environnement, puis sur leurs effets perturbateurs de la fonction thyroïdienne.

Que sont les PBDE ?

Les PBDE sont des substances lipophiles donc faiblement solubles dans l'eau, persistantes et peu volatiles. Leur formule chimique générale est $C_{12}O_1H_{(n)}Br_{(10-n)}$. Il existe 209 congénères en fonction du nombre et de la position des atomes de brome (figures I et II). Les trois principaux PBDE utilisés dans l'industrie sont : le penta-BDE, l'octa-BDE et le déca-BDE.

En raison de leur faible solubilité dans l'eau, on les retrouve accumulés dans les sédiments et les sols. Par ailleurs, les PBDE ont été mis en évidence dans l'air ambiant. La concentration moyenne en PBDE dans la poussière prélevée dans différents foyers est de 1400 ng par gramme de poussière à Toronto (au Canada), de 45000 ng/g à Birmingham, Royaume-Uni et de 4800 ng/g au Texas, USA (Harrad, 2008). Les PBDE sont retrouvés également dans les zones éloignées des sites urbanisés comme en pleine mer baltique, associés aux particules en suspension dans l'eau, à une concentration moyenne de PBDE de $8,6 \text{ pg/m}^3$ avec une large proportion de déca-BDE (Ter Schure, 2004 et Agrell, 2004). Ils sont aussi présents dans l'eau des rivières et des stations d'épuration (Watanabe, 2003) à des doses très faibles mais suffisantes pour en retrouver dans les espèces aquatiques.

De plus, différentes études ont montré la présence des PBDE chez plusieurs espèces animales (oiseaux, mammifères,...). Leur exposition aux PBDE est dépendante de leur alimentation et de leur environnement. Elle est plus élevée chez les animaux vivant près des zones industrielles notamment pour les PBDE fortement bromés. Néanmoins, des taux non négligeables ont été détectés sur la faune vivant sur des sites éloignés ce qui suggère une propagation des PBDE via l'air et les courants marins, notamment pour les PBDE faiblement bromés, plus volatiles.

Les études sur l'exposition de l'homme portent surtout sur le sang, le tissu adipeux et le lait maternel. Les concentrations sanguines sont inversement proportionnelles à l'âge, les jeunes enfants sont donc davantage exposés aux PBDE comme le montre le tableau I (Thomsen, 2007).

Tableau I : Concentrations moyennes (ng/g de lipides) de tétra-BDE et de penta-BDE dans le sérum de Norvégiens en fonction de l'âge (2 sexes mélangés)

Age (année)	0-4	5-14	15-24	25-59	>60
Tétra-BDE	4,8	2,2	1,3	1,3	1,2
Penta-BDE	2,4	0,76	0,41	0,34	0,28

Thomsen, 2007

Une concentration tissulaire moyenne de 4,75 ng de PBDE par gramme de tissu adipeux a été observée en Europe (Covaci, 2002). Le déca-BDE constitue à lui seul environ la moitié de cette concentration (Covaci, 2005). La concentration moyenne dans le lait maternel des sept principaux PBDE les moins bromés allant du tri-BDE à l'hepta-BDE a été évaluée à 3,92 ng/g de lipides et celle des neuf principaux PBDE les plus bromés allant de l'octa-BDE au déca-BDE à 3,79 ng/g (Antignac, 2009), il en résulte une exposition du nourrisson via le lait maternel évaluée à 10 ng/kg/j de PBDE (Zalko, 2003).

La voie d'exposition majoritaire chez l'homme est la voie alimentaire via notamment la consommation de poissons puis de viande et enfin de produits laitiers. L'ingestion de poussières préalablement contaminées représente moins de 4% de l'exposition journalière (Wilford, 2005).

En définitive, leur omniprésence et leur rémanence importante dans l'environnement soulèvent des questions sur le risque toxicologique de ces substances.

Toxicité des PBDE

La toxicité des PBDE a été étudiée essentiellement chez les rongeurs. Ainsi, chez le rat, la DL₅₀ par voie orale est de 5 g/kg pour le déca-BDE alors qu'elle est comprise entre 0,5 et 5 g/kg pour le penta-BDE (Norris, 1975). Les effets toxiques sont observés sur le foie, le rein et la thyroïde. Ils diminuent avec l'augmentation du nombre d'atomes de Brome. En 2001, Darnerud a fait un point sur les différentes NOAEL (No Observable Adverse Effect Level : dose sans effet indésirable) déterminées dans la littérature. La plus faible NOAEL observée chez la souris est de 7500 à 15000 mg/kg de poids vif pour le déca-BDE (NTP, 1986) et de 0,8 mg/kg pour le penta-BDE (Eriksson, 1998, confirmé par Viberg en 2004). En prenant un coefficient de sécurité de 100, on peut considérer que la DJA (Dose Journalière Admissible) est de 75 à 150 mg/kg pour le déca-BDE et de 8 µg/kg pour le penta-BDE. Cependant, en raison de divergences entre les études, il n'existe pas actuellement de normes européennes.

Une des problématiques majeures soulevées par l'utilisation des PBDE et qui fait l'objet de notre étude est leur potentiel perturbateur thyroïdien, associé à leur analogie structurale avec les hormones thyroïdiennes (figures I, II et III). Un perturbateur thyroïdien est une substance qui interfère avec la production, la libération, le transport, le métabolisme, la liaison, l'action ou l'élimination des hormones thyroïdiennes.

La fonction thyroïdienne

Les hormones thyroïdiennes comportent deux noyaux aromatiques reliés entre eux par une liaison diphenyle éther et substitués par des atomes d'iode sur les atomes de carbone 3, 5, 3' et/ou 5'. Les principales hormones thyroïdiennes sont la L-tétraiodo-3, 5, 3', 5'-thyronine ou thyroxine ou T4 et la L-triiodo-3, 5, 3'-thyronine ou T3, sécrétées par la glande thyroïde.

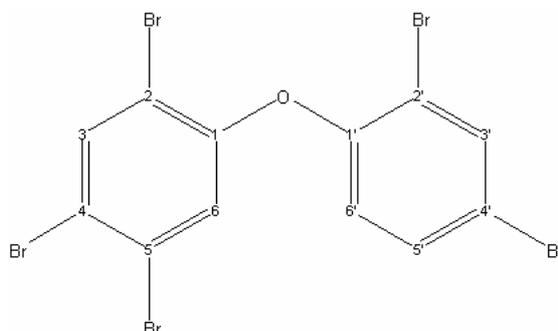


Figure I : Formule chimique du penta-BDE

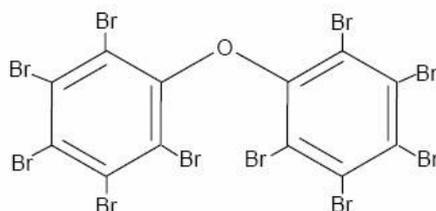


Figure II : Formule chimique du déca-BDE

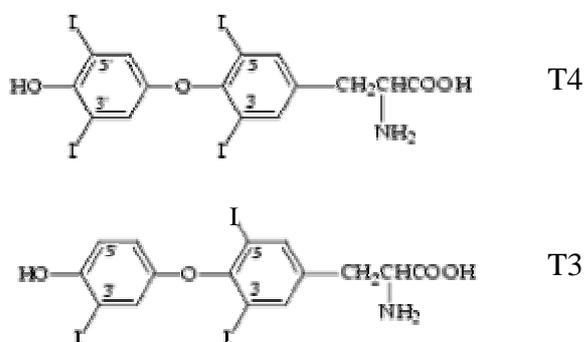


Figure III : Formules chimiques de T4 et de T3

Bien que la concentration de T4 soit supérieure à celle de T3 chez toutes les espèces, T4 est considérée comme une prohormone, la forme active étant la T3 libre. Aussi, la T4, par le biais d'enzymes appelées désiodases, est transformée en T3 qui a une plus forte affinité pour les récepteurs intranucléaires. Le principal site de formation de T3 est le foie mais il existe quelques tissus cibles également capables de désioder la T4 en T3 grâce à différentes désiodases. Il existe trois types de désiodases :

- La désiodase de type I qui transforme la T4 en T3 ou en rT3 (reverse T3, forme inactive) principalement dans le foie et les reins.
- La désiodase de type II située dans le foie, le cerveau, le tissu adipeux et le placenta.
- La désiodase de type III qui transforme les hormones thyroïdiennes en diiodothyronine ou la T4 en rT3 dans le foie, le système nerveux central, la peau, le placenta et le fœtus.

Dans la circulation sanguine, les hormones thyroïdiennes sont transportées par des protéines plasmatiques, différentes selon les espèces, la fraction libre active représente moins de 1% de la concentration totale comme l'illustre le tableau II.

Tableau II : Fractions libres des hormones thyroïdiennes chez l'homme, le mouton et le rat

	Homme (Larsen, 2002)	Mouton (Yokus, 2006)	Rat (Anai, 2001)
Fraction libre de T3	0,3%	0,2%	1%
Fraction libre de T4	0,04%	0,02%	0,07%

Les protéines de transport des hormones thyroïdiennes chez l'homme et la plupart des mammifères sont : la Thyroxin Binding Globulin (TBG), la transthyréline (TTR) et l'albumine. Ces trois molécules permettent le maintien de l'homéostasie de la fonction thyroïdienne en protégeant la T3 et la T4 de leur élimination.

La répartition de la liaison de T4 aux protéines plasmatiques est relativement similaire chez les espèces qui présentent la TBG (chien, cheval, ruminants et homme). La TBG est prépondérante chez l'homme et a une plus grande affinité pour la T4 que pour la T3. Par contre, la TBG est absente chez le rat et la souris mais aussi chez le chat et le lapin. Les hormones thyroïdiennes sont donc transportées majoritairement par l'albumine (exemple du chat) ou la transthyréline (exemple du rat) chez ces espèces. La transthyréline est quant à elle

présente chez toutes les espèces, sauf chez le porc, et a une affinité légèrement supérieure pour la T4 comparativement à la T3 (tableau III, Degroot, 1989).

Tableau III : Pourcentage de T4 liée aux protéines plasmatiques chez différentes espèces

Espèce	TBG	Transthyréline	Albumine
Porc	93	-	7
Chien	60	28	12
Cheval	61	22	17
Homme	73	17	10
Chat	-	39	61
Vache	60	20	20
Brebis	53,1	35,6	11,3
Rat	-	85,1	14,9

Degroot, 1989

L'activité de la thyroïde est régulée par l'axe hypothalamo-hypophysaire. La TRH (Thyrotropin Releasing Hormone) est sécrétée par l'hypothalamus et stimule la libération de TSH (Thyroid Stimulating Hormone) ou thyrotropine par l'adénohypophyse. La TSH stimule à son tour la sécrétion des hormones thyroïdiennes qui exercent un rétrocontrôle négatif, sur leur propre sécrétion, à la fois sur l'hypothalamus et sur l'adénohypophyse (figure IV).

Le rôle essentiel des hormones thyroïdiennes est de réguler le métabolisme basal. Elles favorisent la calorigénèse (lutte contre le froid) et la synthèse d'ATP. Au plan métabolique leur activation se traduit par une stimulation de la glycogénolyse et de la glycolyse musculaire, associée à une augmentation de la gluconéogenèse hépatique et de l'absorption des oses par l'intestin. Les hormones thyroïdiennes entraînent également une augmentation de la lipolyse, de la phosphorylation oxydative, de la synthèse de cholestérol et de la synthèse protéique.

En dehors de ces actions métaboliques, elles interviennent également dans le développement du fœtus et du nouveau-né, notamment du système nerveux central et dans la fonction de reproduction. 75% des enfants masculins touchés par une hypothyroïdie prépubère ont une malformation des testicules (Jannini, 1995). 23,4% des femmes hypothyroïdiennes et 21,5% des femmes présentant une hyperthyroïdie ont des cycles menstruels perturbés (Krassas, 2000).

Le catabolisme des hormones thyroïdiennes ne concerne que la forme libre des hormones, c'est-à-dire non liée aux protéines plasmatiques et se déroule principalement dans le foie par

glucuronoconjugaison ou sulfoconjugaison. Cette conjugaison, en augmentant l'hydrosolubilité des hormones thyroïdiennes, facilite leur élimination biliaire ou urinaire. La glucuronoconjugaison se déroule majoritairement dans le foie mais peut également avoir lieu dans les reins et les intestins. Elle est catalysée par l'UDPGT (Uridine Diphosphoglucuronosyl Transferase), enzyme microsomale hépatique. La sulfoconjugaison est catalysée par les phénolsulfotransférases cytosoliques et permet notamment de faciliter la désiodation chez le rat et l'homme (Curran, 1991).

PBDE et fonction thyroïdienne

Jusqu'à présent, les études sur l'évaluation des altérations de la fonction thyroïdienne par les PBDE ont surtout été conduites chez le rat et la souris.

En raison de l'analogie structurale des PBDE et des hormones thyroïdiennes, les PBDE interfèrent potentiellement à différents niveaux de la régulation de la fonction thyroïdienne. Les PBDE entraînent une diminution de la concentration de T4 libre ainsi qu'une altération de la liaison de T4 à la transthyréline chez des rats femelles après 14 jours d'exposition à une molécule de tétra-BDE à la dose de 18 mg/kg/j (Hallgren, 2002). De même, des milieux issus de l'incubation de microsomes hépatiques (1 mg/mL) avec des penta-BDE et des tétra-BDE (10 µmol/mL), diminuent de 60% la liaison de T4 à la transthyréline humaine (étude *in vitro* de Meerts, 2000).

Les PBDE modifient les concentrations plasmatiques de TSH. Ainsi, une administration par voie orale de DE-71 (mélange de PBDE majoritairement composé de penta-BDE et de tétra-BDE) à des doses de 30 ou 60 mg/kg/j à de jeunes rats mâles du 23^{ème} au 53^{ème} jour post natal, entraîne une augmentation de la TSH au 31^{ème} jour d'exposition (Stoker, 2004).

Les PBDE agissent également sur la glucuronoconjugaison des hormones thyroïdiennes en interférant avec l'UDPGT. Ainsi, l'exposition de rates gravides au penta-BDE à une dose de 300 µg/kg au 6^{ème} jour de gestation entraîne une diminution de l'activité UDPGT sur les femelles de la portée 1 jour après la naissance (Kuriyama, 2007).

La figure IV résume la régulation de la fonction thyroïdienne et les principaux sites d'action des PBDE.

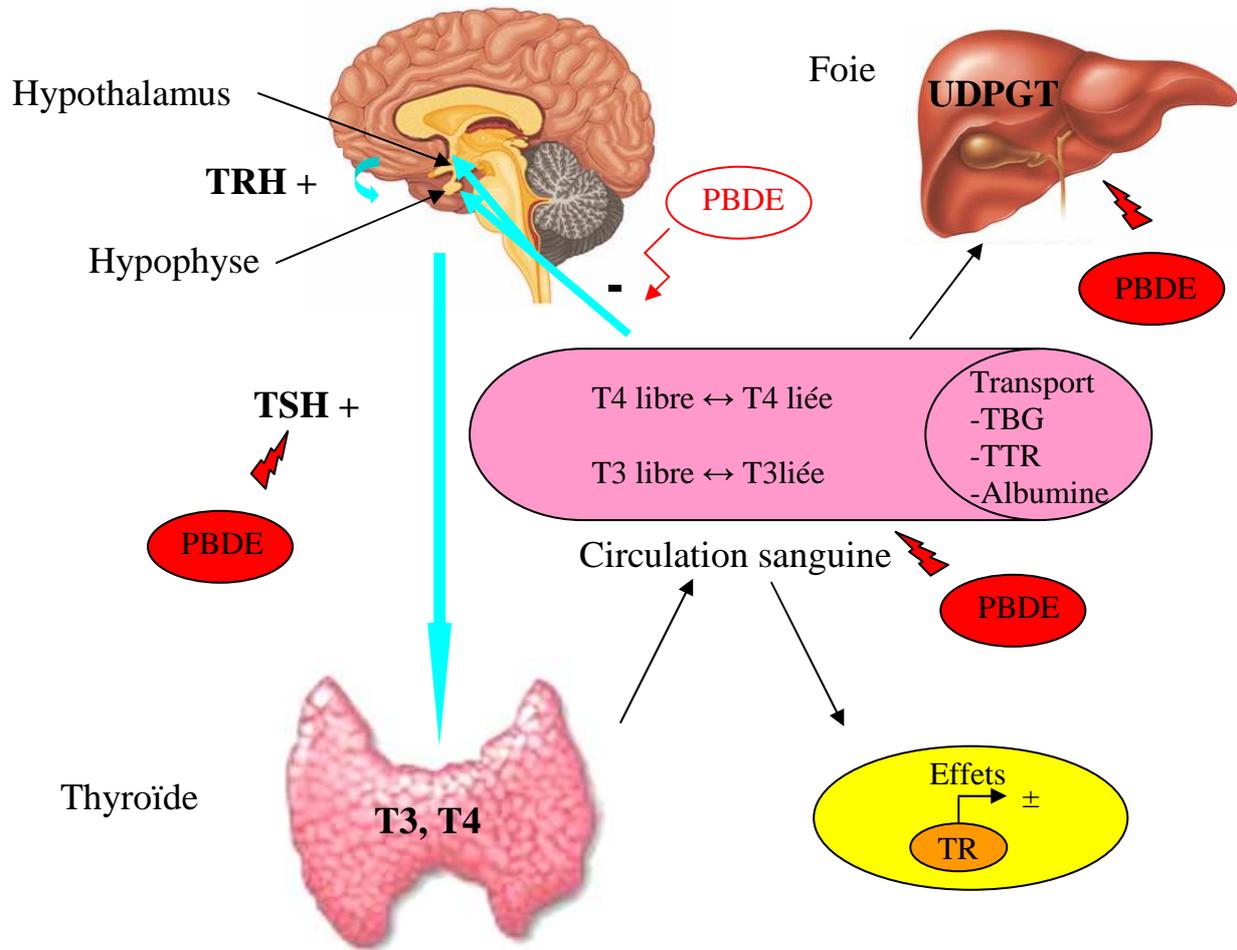


Figure IV : Principaux sites d'action des PBDE sur la fonction thyroïdienne

La production des hormones thyroïdiennes est contrôlée à l'étage hypothalamique par la sécrétion de TRH qui stimule la production de TSH au niveau de l'hypophyse, elle-même stimulant la production de T3 et de T4 dans la thyroïde. Après leur libération dans la circulation périphérique, les hormones thyroïdiennes se trouvent presque exclusivement sous forme liée à trois protéines plasmatiques de liaison : la TBG, la TTR et l'albumine. T3 libre et T4 libre ont une action biologique dans l'organisme et exercent un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de TRH et de TSH.

Le catabolisme des hormones thyroïdiennes comprend une glucuroconjugaison grâce à l'UDPGT au niveau hépatique.

Effets des PBDE :

- ⚡ • Les PBDE peuvent agir sur la régulation des hormones thyroïdiennes au niveau de la TSH.
- Ils peuvent modifier les pourcentages de fraction libre de T3 et de T4 en interférant avec les protéines plasmatiques de transport.
- Les PBDE peuvent intervenir dans le catabolisme des hormones thyroïdiennes en agissant sur UDPGT.
- ➡ • Ils pourraient agir sur le rétrocontrôle négatif exercé par les formes libres.

TRH : Thyrotropin Releasing Hormone
 TSH : Thyroid Stimulating Hormone ou thyrotropine
 UDPGT : Uridine Diphosphoglucuronosyl Transferase
 TBG : Thyroxin Binding Globulin
 TTR : Transthyréline

Compte tenu du risque potentiel des PBDE pour la santé humaine, des mesures restrictives d'utilisation des PBDE ont été prises au sein de l'Union Européenne. Depuis 2004, l'utilisation des PBDE faiblement bromés est interdite, seul le déca-BDE était encore utilisé (directive 2002/95/CE). Cependant, récemment, depuis juillet 2008, le déca-BDE a fait l'objet de mesures supplémentaires, il est interdit dans les produits électroniques, mais reste autorisé notamment dans les textiles et les plastiques (arrêté du 1^{er} avril 2008 annulant l'exemption dont bénéficiait le déca-BDE dans la directive 2002/95/CE). Cependant, sous l'effet des rayonnements ultraviolets, le déca-BDE peut perdre des atomes de brome (Olsman, 2006). De plus, des travaux récents montrent que le déca-BDE peut être métabolisé chez l'homme en PBDE moins bromés par les bactéries du tube digestif (Thuresson, 2006). C'est pourquoi, l'évaluation des risques liés à l'utilisation du déca-BDE représente encore aujourd'hui un enjeu de santé publique.

Dans ce contexte, notre étude a pour but d'évaluer le risque potentiel d'altération de la fonction thyroïdienne par les PBDE dans un modèle ovin. Deux PBDE ont été étudiés. Le déca-BDE, le seul encore autorisé dans des conditions restreintes dans l'Union Européenne, et le penta-BDE, une molécule au potentiel perturbateur thyroïdien avéré. Pour obtenir des résultats pertinents et extrapolables vis-à-vis de la santé publique, nous avons choisi le modèle ovin dont la régulation de la fonction thyroïdienne est plus proche de celle de l'homme que le rat. En effet, les ovins présentent des protéines de transport (notamment la TBG) dans des proportions analogues à celles rapportées chez l'homme (tableau III, Degroot, 1989).

Nos travaux ont pour but d'évaluer l'altération de la fonction thyroïdienne chez la brebis après un traitement au penta-BDE ou au déca-BDE. La fonction corticosurrénalienne a également été évaluée. Pour cela, les profils de concentrations plasmatiques des hormones thyroïdiennes, de TSH et du cortisol ont été comparés avant et après 28 jours de traitement aux PBDE. L'effet des PBDE sur les paramètres pharmacocinétiques de la T4 a été déterminé sur un modèle de brebis thyroïdectomisées. Enfin, l'effet des PBDE sur la liaison de la T3 aux protéines plasmatiques a été évalué.

I. Matériel et méthodes

I.1. Animaux

L'étude a été réalisée sur 15 brebis de race Lacaune fournie par le GAEC Girard Cannac à Durenque et par l'EARL de Calot. Elles étaient âgées de 1 à 6 ans. Elles ont été logées dans des boxes collectifs et ont été nourries avec 300 g/j de granulés et du foin *ad libitum*. Entre le 28^{ème} et le 32^{ème} jour de traitement (J28 et J32), des thyroïdectomies ont été réalisées sur toutes les brebis. A la fin des expériences (J90), elles ont été euthanasiées et différents organes ou tissus ont été collectés : glande surrénale, cerveau, hypophyse, graisse, foie, rein et coeur.

Les brebis ont été réparties aléatoirement en 3 groupes homogènes par rapport aux poids corporels :

- 5 brebis témoins ($73,7 \pm 7,7$ kg)
- 5 brebis traitées au déca-BDE ($73,3 \pm 7,4$ kg)
- 5 brebis traitées au penta-BDE ($70,6 \pm 5,0$ kg)

Une brebis du groupe témoin (B2) a présenté un profil de concentration d'hormones thyroïdiennes, une décroissance de concentrations de T4 après administration de thyroxine et des paramètres de liaison de la T3 aux protéines plasmatiques aberrants. Elle a été exclue de nos analyses.

Une brebis du groupe penta-BDE (B11) est morte au moment de l'anesthésie avant la thyroïdectomie (J28). L'étude de la pharmacocinétique de T4 et des PBDE, les pesées des différents organes ainsi que l'étude de la liaison T3-protéines plasmatiques (J39 à J46) ne prennent donc pas en compte cette brebis.

Enfin, une autre brebis du groupe penta-BDE (B13) est morte accidentellement à J66. L'étude de la pharmacocinétique des PBDE et la pesée des organes à J90 n'incluent pas cette brebis.

I.2. Préparation des solutions à administrer

I.2.1. Solutions plasmatiques de penta-BDE, de déca-BDE et de plasma contrôle

Le penta-BDE (TBDE-71X, bcpinstruments, Irigny – France, fiche d'analyse : 56 % de penta-BDE, 35 % de tétra-BDE, 9 % d'hexa-BDE, 0,4 % de tri-BDE, 0,2 % d'hepta-BDE) et le

déca-BDE (Sigma-Aldrich, Snellendorf – Allemagne) ont été dissous dans une solution de DMSO et d'acétonitrile à la concentration finale de 1 mg/mL. Cette solution a elle-même été dissoute dans du plasma de chaque brebis, pour obtenir une solution à administrer à la concentration de 2 µg de PBDE/mL.

Une solution identique d'acétonitrile et de DMSO a été préparée et ajoutée dans les mêmes proportions au plasma des brebis témoins.

Le volume de solution administrée par voie intraveineuse (IV) a été ajusté au poids corporel de chaque individu, déterminé chaque semaine.

Toutes les solutions ont été aliquotées et conservées à -18°C à l'abri de la lumière et décongelées extemporanément avant les administrations.

I.2.2. Solution de T3

Une solution mère de T3 (Sigma-Aldrich, Snellendorf – Allemagne) à la concentration de 3 mg/mL a été préparée en diluant 150 mg de T3 dans un solvant contenant 0,4 mol/L de NaOH, 40% d'eau apyrogène et 60% d'éthanol.

Pour préparer la solution à injecter à la concentration de 300 µg/mL de T3, 5 mL de la solution mère ont été dilués dans 45 mL de solvant contenant 2,47 g de bicarbonate de sodium dans 50 mL de sérum physiologique stérile apyrogène.

I.2.3. Solution de T4

Une solution mère de T4 (Sigma-Aldrich, Snellendorf – Allemagne) à la concentration de 4 mg/mL a été préparée dans un solvant à la concentration finale de 0,4 mol/L de NaOH (16 g/L) contenant 60% d'éthanol pur et 40% d'eau stérile.

La solution injectée contenait 200 µg/mL de T4. La solution mère a été diluée dans un tampon phosphate de sodium 10 mmol/L, pH 7,4, 0,1% de BSA et filtrée sur 0,45µm.

Les solutions de T3 et de T4 ont été conservées à +4°C à l'abri de la lumière.

I.3. Plan expérimental

Des cathéters ont été mis en place sur chaque brebis à J-1 à la veine jugulaire gauche et ont été utilisés jusqu'à la fin de l'étude (J90) pour les administrations de PBDE, de plasmas contrôle et de T4.

L'étude a duré 90 jours pendant les mois de mars, avril et mai 2007 avec deux périodes (figure V) :

- Une première période de 28 jours pendant laquelle les brebis ont reçu des administrations quotidiennes de PBDE ou de plasma contrôle. Cette période a permis d'étudier l'effet des PBDE sur les profils de concentration en T3, T4 (libres et totales), TSH et cortisol.
- Une seconde période allant de J28 à J47 sur un modèle de brebis thyroïdectomisées (entre J28 et J32). Elles ont reçu, en plus des PBDE, des administrations quotidiennes de T3. Ce modèle de brebis euthyroïdiennes pour T3 a permis d'étudier la pharmacocinétique de T4 à J47, après la décroissance des concentrations endogènes de T4.

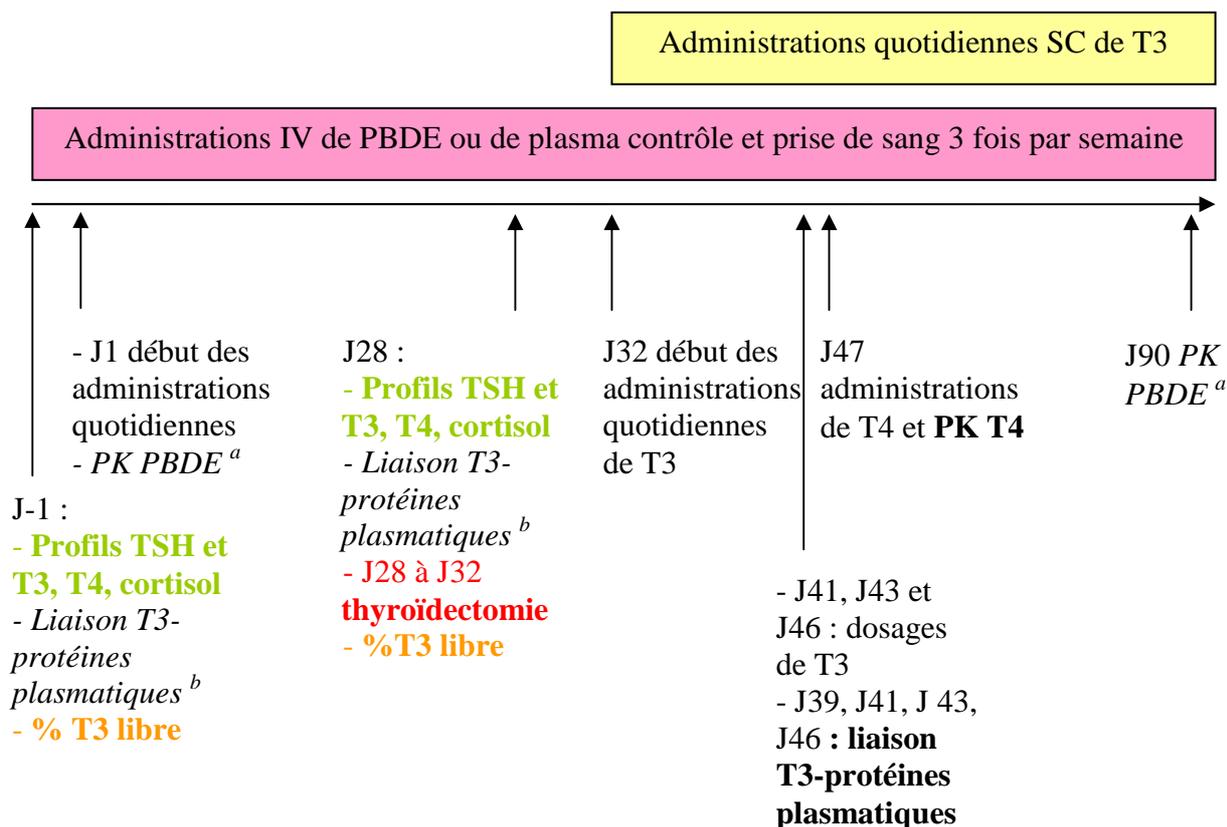


Figure V : Représentation schématique du plan expérimental

a : les PBDE n'ont pas encore été dosés au moment de la rédaction de ce manuscrit

b : réalisé à titre d'essai seulement sur 2 brebis par groupe PBDE

PK : pharmacocinétique

L'étude de l'effet des PBDE sur la liaison de la T3 aux protéines plasmatiques a été réalisée au cours de la première période avant et après traitement PBDE et au cours de la deuxième période (pools de plasmas prélevés à J39, J41, J43 et à J46).

Les brebis ont ensuite été traitées jusqu'à J90 pour réaliser la pharmacocinétique des PBDE et abattues 24 heures après la dernière administration.

I.3.1. Profils de concentration des hormones thyroïdiennes, de TSH et de cortisol

Des prélèvements sanguins ont été effectués toutes les heures pendant 12 heures sur les 15 brebis pour établir les profils de concentrations plasmatiques de T3, de T4 (totales et libres), de TSH et de cortisol, avant (J-1) et après 28 jours de traitement au déca-BDE, au penta-BDE ou au solvant.

Des prélèvements sanguins de 100 mL ont été réalisés au cours des profils dans le but d'évaluer les effets du traitement aux PBDE sur la liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines plasmatiques.

I.3.2. Administrations des PBDE et de plasmas contrôle

Les administrations des PBDE et des plasmas contrôle ont commencé à J1 (jusqu'à J90). Elles ont été réalisées quotidiennement pendant les 90 jours entre 8h00 et 11h00.

Les traitements ont été administrés par voie intraveineuse à la dose de 100 ng/kg.

I.3.3. Pharmacocinétique des PBDE

Des prélèvements sanguins ont été effectués pour évaluer la décroissance des concentrations de PBDE durant 24 heures après la première et la dernière administration.

En raison de la difficulté méthodologique, cette évaluation n'a pas encore été réalisée au moment de la rédaction de ce manuscrit.

I.3.4. Exposition aux PBDE

Des prélèvements sanguins ont été réalisés 3 fois par semaine (lundi, mercredi, vendredi) de J1 à J90. Ils étaient effectués juste avant les administrations intraveineuses de PBDE ou de plasma contrôle, afin de déterminer l'exposition des brebis au penta-BDE et au déca-BDE, ou les concentrations en hormones thyroïdiennes au cours du traitement.

I.3.5. Administration de T3 et validation du modèle

Dès le lendemain de la thyroïdectomie (entre J28 et J32) et jusqu'à J86, la T3 a été administrée quotidiennement aux 15 brebis par voie sous cutanée à la dose de 3 µg/kg afin de maintenir un état euthyroïdien vis-à-vis de la T3.

Pour vérifier notre modèle euthyroïdien pour T3, les concentrations plasmatiques de T3 ont été dosées à J41, J43 et J46 après le début du traitement PBDE.

I.3.6. Pharmacocinétique de T4

A J47, après élimination de la T4 endogène, la thyroxine a été administrée aux brebis à la dose de 10 µg/kg par voie intraveineuse.

Des prélèvements sanguins ont été effectués 30, 15 min et juste avant l'administration de T4, puis aux temps 1, 2, 4, 8, 15, 30, 45, 60, 90, 120 min post injection, toutes les heures jusqu'à 12h, aux temps 24, 36, 48h et tous les jours pendant 10 jours.

I.3.7. Evaluation de l'effet des PBDE sur la liaison aux protéines plasmatiques

I.3.7.1. Etudes *in vitro*

L'influence du traitement PBDE sur la liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines plasmatiques a été évaluée *in vitro* en dosant par radioimmunologie la T3 libre et la T3 totale en présence de concentrations croissantes de déca-BDE et de penta-BDE (0, 0,1, 1, 10 et 100 µg/mL) sur un pool de plasmas provenant de 4 brebis thyroïdectomisées supplémentées en T3 à la dose de 3 µg/kg par voie SC.

Dans un second temps, la capacité des PBDE à déplacer la T3 de ses sites de liaison aux protéines plasmatiques a été évaluée via la détermination du pourcentage de T3 libre par la méthode de dialyse à l'équilibre en l'absence et en présence de 4 concentrations de déca-BDE et de penta-BDE. Le penta-BDE et le déca-BDE ont été ajoutés aux concentrations finales de 0, 10, 100, 500 et 1000 ng/mL dans le pool de plasma déthyroïdé de brebis surchargé en T3 à une concentration de 5 ng/mL.

I.3.7.2. Etudes *in vivo*

L'effet du traitement PBDE sur la liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines plasmatiques a été évalué par une méthode de dialyse à l'équilibre dans trois expériences :

- Sur les 15 brebis entières, le pourcentage de T3 libre a été évalué par dialyse à l'équilibre avant et après les 28 jours de traitement aux PBDE. La dialyse a été réalisée sur les 5^{ème} et 12^{ème} prélèvements sanguins des profils pour lesquels, les dosages de la T3 totale et libre ont été réalisés par radioimmunologie.
- A titre d'essai, la dialyse à l'équilibre a été réalisée sur le plasma de deux brebis avant et après traitement au déca-BDE (B6 et B7) et de deux brebis avant et après traitement au penta-BDE (B11 et B12) pour évaluer l'effet du traitement sur les paramètres de liaison de T3 aux protéines plasmatiques. 40 mL de plasma collectés avant et après 28 jours de traitement aux PBDE ont été utilisés et déthyroïdés avec du charbon-dextran.
- La dialyse à l'équilibre a été réalisée sur les 14 brebis thyroïdectomisées et supplémentées en T3 pour évaluer l'effet des 39-46 jours de traitement PBDE sur les paramètres de liaison de T3 aux protéines plasmatiques. Un pool de plasma prélevé à J39, J41, J43 et J46 a été utilisé, sans déthyroïdation préalable. La concentration en T3 totale du pool a été mesurée par dosage radioimmunologique.

I.4. Procédures expérimentales

I.4.1. Thyroïdectomie et pesée des thyroïdes

Les thyroïdectomies ont été réalisées sur les 15 brebis entre J28 et J32.

Les animaux ont été mis à jeun pendant 48 heures et anesthésiés avec du thiopental (Nesdonal[®], Merial, France) à la dose de 15 mg/kg, relayé par une anesthésie gazeuse à l'isoflurane (1,7%) pendant toute la durée de l'intervention.

Les animaux ont été placés en décubitus dorsal, l'encolure en hyperextension. La zone opératoire (plan médian de la face ventrale de l'encolure juste en arrière des cartilages du larynx) a été tondue et préparée selon les règles d'asepsie chirurgicale.

Une incision cutanée a été réalisée médialement sur 10 cm, 1cm en arrière du pôle postérieur du larynx parallèlement à la trachée. La glande thyroïde étant richement vascularisée, un coagulateur électrique a été utilisé pour réaliser l'hémostase. Le tissu conjonctif sous-cutané a été disséqué puis les muscles sternaux thyroïdiens et sternaux hyoïdiens ont été réclinés afin de dégager la face ventrale de la trachée et de visualiser l'isthme connectif reliant les deux

lobes de la glande thyroïde. L'isthme connectif a été disséqué et dissocié de la face ventrale de la trachée et a été coupé en deux parties médialement sur la trachée. Les deux lobes de la thyroïde situés de chaque côté de la trachée ont été disséqués au bistouri électrique. L'intégrité de la capsule de la thyroïde a été respectée et les principaux vaisseaux ont été ligaturés avec du fil résorbable. Une première suture du tissu conjonctif sous-cutané a été réalisée avec du fil résorbable. Le plan cutané a été suturé avec des points séparés en X.

Pour couvrir les risques infectieux post opératoires, les brebis ont reçu pendant 4 jours un antibiotique à base d'amoxicilline (Longamox[®], Vétoquinol, France) à la dose de 25 mg/kg/48h.

Les glandes thyroïdes ont été pesées pour les 14 brebis.

I.4.2. Pesée des glandes surrénales et des hypophysés

La pesée des glandes surrénales et des hypophysés a été réalisée le jour de l'euthanasie (J90) pour les 13 brebis.

I.4.3. Réalisation des prélèvements sanguins

Des prélèvements sanguins ont été réalisés par ponction directe de la veine jugulaire droite.

- 5 mL de sang ont été prélevés dans un tube hépariné (héparinate de lithium) en polypropylène pour le dosage de T3 et de T4
- 10 mL de sang ont été prélevés dans un tube hépariné en verre pour le dosage des PBDE

I.4.4. Traitement des prélèvements sanguins

Les prélèvements sanguins ont été centrifugés pendant 10 minutes à 4000 g dans un délai n'excédant pas une heure après leur obtention. Le plasma a été aliquoté dans des tubes en polypropylène pour les dosages de T3 et de T4 et dans des tubes en verre ambré pour le dosage des PBDE. Les plasmas ont été immédiatement congelés et conservés à -20°C jusqu'à la réalisation des dosages.

I.4.5. Méthodes de dosages

I.4.5.1. Dosage de la TSH

Les concentrations en TSH ont été évaluées par dosage radioimmunologique à l'ENVT avec les réactifs du NHPP (NHPP, Harbor UCLA R.E.I., St Torrance, CA USA).

La répétabilité et la reproductibilité de ce dosage sont présentées dans le tableau IV.

Tableau IV : Répétabilité et reproductibilité du dosage de la TSH pour 2 contrôles qualité (0,3 et 1,5 ng/mL)

Concentration de TSH contrôle qualité (ng/mL)	Répétabilité (%)	Reproductibilité (%)
0,3	22,1	22,9
1,5	14,3	16,8

I.4.5.2. Dosages de T3, de T4 (libres et totales) et du cortisol

Les concentrations plasmatiques de T3, de T4 (libres et totales) et du cortisol ont été évaluées par dosage radioimmunologie validé à l'ENVT (Siemens Health Diagnostics, Los Angeles, CA, USA).

La répétabilité et la reproductibilité de chacun de ces dosages sont présentées dans les tableaux suivants (tableaux V à IX).

Tableau V : Répétabilité et reproductibilité du dosage de T3 libre pour 3 contrôles qualité (0,3, 1,5 et 4 pg/mL)

Concentration de T3 libre contrôle qualité (pg/mL)	Répétabilité (%)	Reproductibilité (%)
0,3	6,49	6,49
1,5	7,02	7,02
4	4,10	4,10

Tableau VI : Répétabilité et reproductibilité du dosage de T3 totale pour 3 contrôles qualité (0,3, 1,5 et 2 ng/mL)

Concentration de T3 totale contrôle qualité (ng/mL)	Répétabilité (%)	Reproductibilité (%)
0,3	7,61	7,87
1,5	4,13	4,13
2	5,28	5,77

Tableau VII : Répétabilité et reproductibilité du dosage de T4 libre pour 3 contrôles qualité (10, 50 et 150 pg/mL)

Concentration de T4 libre contrôle qualité (pg/mL)	Répétabilité (%)	Reproductibilité (%)
10	16,4	19,1
50	10,1	10,4
150	7,66	10,1

Tableau VIII : Répétabilité et reproductibilité du dosage de T4 totale pour 3 contrôles qualité (10, 50 et 150 ng/mL)

Concentration de T4 totale contrôle qualité (ng/mL)	Répétabilité (%)	Reproductibilité (%)
10	17,6	21,3
50	6,94	13,4
150	10,0	10,0

Tableau IX : Répétabilité et reproductibilité du dosage du cortisol pour 3 contrôles qualité (15, 150 et 300 ng/mL)

Concentration du cortisol contrôle qualité (ng/mL)	Répétabilité (%)	Reproductibilité (%)
15	13,5	16,6
150	7,33	7,33
300	6,72	6,72

I.4.6. Analyse pharmacocinétique de T4 (libre et totale)

L'évolution temporelle des concentrations en T4 (libre et totale), après une administration de thyroxine à la dose de 10 µg/kg par voie IV, a été ajustée à un modèle tricompartmental (figure VI) avec le logiciel Winnonlin[®] version 5.2. Les paramètres pharmacocinétiques suivants : la clairance plasmatique (Cl), le volume du compartiment central (Vc), le volume de distribution à l'équilibre (Vss) et le temps de demi-vie (t_{1/2}) ont été calculés.

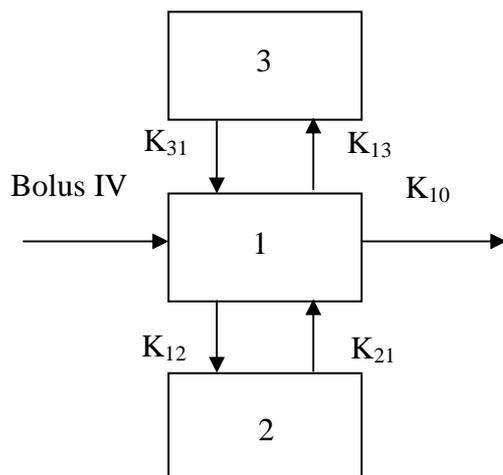


Figure VI : Schéma du modèle tricompartimental de la pharmacocinétique de la T4

Avec :

- 1 : compartiment central, 2 et 3 : compartiments périphériques
- K_{12} et K_{13} : constantes de premier ordre du compartiment central vers les compartiments périphériques
- K_{21} et K_{31} : constantes de premier ordre des compartiments périphériques vers le compartiment central
- K_{10} : la constante d'élimination du compartiment central

Les données des concentrations plasmatiques de T4 ont été ajustées à l'équation tri-exponentielle 1.

$$C(t) = A \exp(-\alpha t) + B \exp(-\beta t) + C \exp(-\gamma t) \quad \text{Equation 1}$$

Où

- $C(t)$ représente la concentration plasmatique en T4 au temps t (h).
- A , B et C sont les constantes et α , β , et γ sont les exposants.

La méthode de Gauss-Newton a été utilisée comme méthode de minimisation de la somme des carrés des résiduelles. Les paramètres pharmacocinétiques ont été pondérés par l'inverse du carré des valeurs estimées.

La clairance plasmatique (mL/min/kg) a été calculée selon l'équation 2.

$$Cl = \text{Dose} / \text{AUC} \quad \text{Equation 2}$$

Où

AUC (ng.h/mL) est l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques de T4 en fonction du temps, calculée en utilisant la méthode des trapèzes avec extrapolation à l'infini.

Le volume de distribution du compartiment central (L/kg) a été calculé à l'aide de l'équation 3.

$$V_c = \text{dose} / (A + B + C) \quad \text{Equation 3}$$

Le volume de distribution à l'équilibre (L/kg), a été calculé à l'aide de l'équation 4.

$$V_{ss} = V_c (1 + K_{12}/K_{21} + K_{13}/K_{31}) \quad \text{Equation 4}$$

Où

K_{12} , K_{21} , K_{13} et K_{31} sont les constantes de premier ordre traduisant les échanges entre les compartiments du modèle.

Le temps de demi-vie de la thyroxine (h) a été calculé selon l'équation 5.

$$t_{1/2} = \text{Log}2 / \lambda_n \quad \text{Equation 5}$$

Où

λ_n est la pente terminale

Le temps moyen de résidence (h) a été calculé selon l'équation 6.

$$\text{MRT} = \text{AUMC} / \text{AUC} \quad \text{Equation 6}$$

Où

AUMC est l'aire sous la courbe des moments statistiques observée après l'administration IV de T4.

I.4.7. Dialyse à l'équilibre

Le système Dianorm[®] (CH8135, Langenau, Zurich) qui utilise deux demi-cellules en téflon (Diachema[®] 16-10, Scientetec, ZA Courtaboeuf, Les Ulis) séparées par une membrane semi-perméable en cellulose qui exclut le passage des substances de poids moléculaire supérieur à 5000 ou 10000 Da a été utilisé.

Une solution de T3 marquée à l'iode 125 à 318 $\mu\text{Ci/mL}$ en solution dans un mélange propanol : H₂O (1 :1) (Perkin Elmer, Radioactivité spécifique : 125 MBq/ μg ou 3390 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) a été utilisée comme traceur et ajoutée aux solutions plasmatiques de T3 de façon à ce que la radioactivité de la solution plasmatique soit de l'ordre de 766000 dpm/mL, ce qui correspond à une concentration en T3 radiomarquée de l'ordre de 0,1 ng/mL, négligeable devant les concentrations plasmatiques en T3 froide (0,5-750 ng/mL). Des volumes de 900 μL de plasma surchargé et de tampon de dialyse (Na₂HPO₄ 22,46 mmol/L, NaH₂PO₄ 5,62 mmol/L et NaCl 95 mmol/L) ont été introduits respectivement dans chacune des demi-cellules de dialyse. Celles-ci ont été placées pendant une heure dans un bain marie à la température de 37°C et

soumises à une rotation constante de 20 rpm. A la fin de l'incubation, les solutions de plasma et de tampon dialysés ont été prélevées.

La méthode de dialyse à l'équilibre se heurte à une difficulté méthodologique liée à la faible importance de la fraction libre de la T3 (0,2 %). Le dialysat est inévitablement contaminé par une quantité de radioactivité portée par les résidus d'iode radioactif (radiolyse) qui excède la quantité de radioactivité portée par l'hormone. Nous avons adapté la méthode développée par Sterling et Brenner (1966) pour précipiter la T3 radiomarquée des dialysats avec des sels de magnésium. La radioactivité du tampon dialysé non précipité, du tampon dialysé précipité et du plasma dialysé a été comptée à l'aide d'un spectromètre.

Les concentrations effectives en T3 dans le plasma dialysé à l'équilibre (PE) peuvent être calculées à partir de la concentration plasmatique initiale en T3 (PT) et de la radioactivité de part et d'autre de la membrane de dialyse (équation 7).

$$PE = PT \times (dpm_{\text{plasmadialysé}} / (dpm_{\text{dialprep}} + dpm_{\text{plasmadialysé}})) \quad \text{Equation 7}$$

Où

- dpm_{dialprep} correspond à la quantité de radioactivité du dialysat après précipitation.
- $dpm_{\text{plasmadialysé}}$ correspond à la quantité de radioactivité du plasma dialysé corrigée en enlevant la radioactivité portée par les résidus d'iode libre.

Pour cela, le pourcentage de radioactivité portée par les résidus d'iode libre a été estimé en faisant la différence entre la quantité de radioactivité totale du dialysat (dpm_{dialtot}) et celle du culot (dpm_{dialprep}) en corrigeant par les volumes correspondants :

$$\text{Pourcentage radioactivité résidus d'iode} = (dpm_{\text{dialprep}} - dpm_{\text{dialtot}}) / dpm_{\text{dialtot}} \quad \text{Equation 8}$$

Les équations 9 et 10 donnent les concentrations en T3 libre (F) et liée (B) à l'équilibre.

$$F = PE \times (dpm_{\text{dialprep}} / dpm_{\text{plasmadialysé}}) \quad \text{Equation 9}$$

$$B = PE - F \quad \text{Equation 10}$$

Le pourcentage de T3 libre (F%) à l'équilibre peut être déterminé à l'aide des équations suivantes :

$$F(\%) = F \times 100 / PE \quad \text{Equation 11}$$

$$\text{D'où } F(\%) = dpm_{\text{dialprep}} / dpm_{\text{plasmadialysé}} \quad \text{Equation 12}$$

La concentration en T3 libre de l'échantillon de plasma (Féch) est évaluée à partir de l'équation 13.

$$Féch = PT \times F(\%) \quad \text{Equation 13}$$

$$D'où Féch = PT \times (dpm_{\text{dialprep}} / dpm_{\text{plasmadialysé}}) \quad \text{Equation 14}$$

Les concentrations en T3 liée aux protéines plasmatiques ont été représentées graphiquement en fonction des concentrations en T3 libre. Les données ont été ajustées à l'aide de l'équation suivante :

$$B = (B_{\text{max}} \times F) / (K_d + F) + NS \times F \quad \text{Equation 15}$$

Où

- B est la concentration en hormone liée aux protéines plasmatiques.
- B_{max} est la capacité maximale de liaison de T3 à la TBG.
- K_d est la constante de dissociation à l'équilibre du complexe TBG-T3.
- F est la concentration en T3 libre.
- NS est la constante de liaison non spécifique de T3 à la TTR et à l'albumine.

Les paramètres B_{max}, K_d, NS ont été évalués par régression non linéaire à l'aide du logiciel Winnonlin[®].

I.5. Analyses statistiques

Pour chaque paramètre, les moyennes \pm écart type (ET) ont été calculées. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Systat[®] version 10.

Pour les concentrations des différentes hormones (T3, T4 (libres et totales), TSH et cortisol), pour chaque paramètre et pour chaque brebis, le rapport de la moyenne des concentrations après 28 jours de traitement sur la moyenne avant traitement a été calculé.

L'effet des traitements sur ces différents rapports et sur les paramètres pharmacocinétiques de la T4 a été étudié à l'aide du modèle d'analyse de variance à un facteur :

$$Y_i = \mu + A_i + \varepsilon_i$$

Avec :

Y_i est la réponse observée pour le traitement i

μ est la moyenne générale

A_i est l'effet du traitement i : effet groupe

ε_i est le terme d'erreur résiduelle du modèle

L'effet du traitement est considéré significatif lorsque $p < 0,05$.

Lorsqu' un effet traitement a été observé, les trois groupes ont été comparés deux à deux en prenant en compte le facteur de correction de Bonferroni.

II. Résultats

II.1. Effet des PBDE sur la TSH

La méthode de dosage n'a pas été assez sensible (LOQ = 0,1 ng/mL) pour déterminer les profils de concentration plasmatique de TSH. En effet, les concentrations plasmatiques de TSH chez la brebis sont de l'ordre de 0,1 ng/mL.

Toutefois, le traitement aux PBDE à la dose de 100 ng/kg/j ne semble pas augmenter de manière importante les concentrations de la TSH car, après 28 jours de traitement, elles restent proches de la LOQ.

La figure VII présente le poids moyen \pm ET des hypophyses après 90 jours de traitement PBDE à la dose de 100 ng/kg/j par voie IV avec respectivement, pour le groupe témoin, déca et penta-BDE, des poids d'hypophyse de $1,49 \pm 0,53$; $1,33 \pm 0,51$ et $1,67 \pm 0,45$ g.

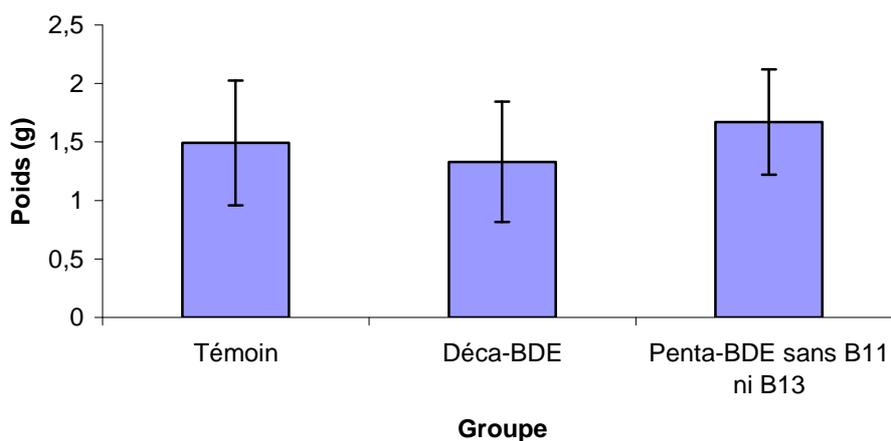


Figure VII : Moyennes \pm ET des poids en gramme des hypophyses après 90 jours de traitement placebo ou PBDE à la dose de 100 ng/kg/j par voie IV

Le traitement PBDE n'a pas eu d'influence sur le poids de l'hypophyse (ANOVA, $p = 0,67$).

L'examen macroscopique des hypophyses a mis en évidence une excroissance hypophysaire pour les trois brebis du groupe penta-BDE (B12, B14 et B16). Toutefois, cette modification macroscopique n'a pas été explorée à l'histologie.

II.2. Effet des PBDE sur la fonction thyroïdienne

II.2.1. Effet des PBDE sur les concentrations plasmatiques de T4 et de T3 (libres et totales)

La figure VIII présente les profils de concentration de T4 libre avant et après 28 jours de traitement placebo ou PBDE à la dose de 100 ng/kg/j par voie intraveineuse.

L'inspection visuelle de cette figure montre qu'il n'y a pas eu de variation de concentration de cette hormone au cours de la journée chez les brebis et que 28 jours de traitement PBDE n'ont pas eu d'effet sur le profil de concentration de T4 libre.

Les profils de concentration de T4 totale, de T3 libre et de T3 totale sont similaires et montrent qu'il n'y a pas eu d'effet du traitement PBDE quelque soit l'hormone.

Le tableau X présente les moyennes des concentrations de T4 et de T3 (libres et totales) avant et après 28 jours de traitement placebo ou PBDE ainsi que le rapport de leurs concentrations moyennes (après / avant) pour chacun des trois groupes. Les traitements PBDE n'ont pas modifié les concentrations de T4 libre (ANOVA, $p = 0,937$), de T4 totale ($p = 0,843$), de T3 libre ($p = 0,464$) et de T3 totale ($p = 0,996$).

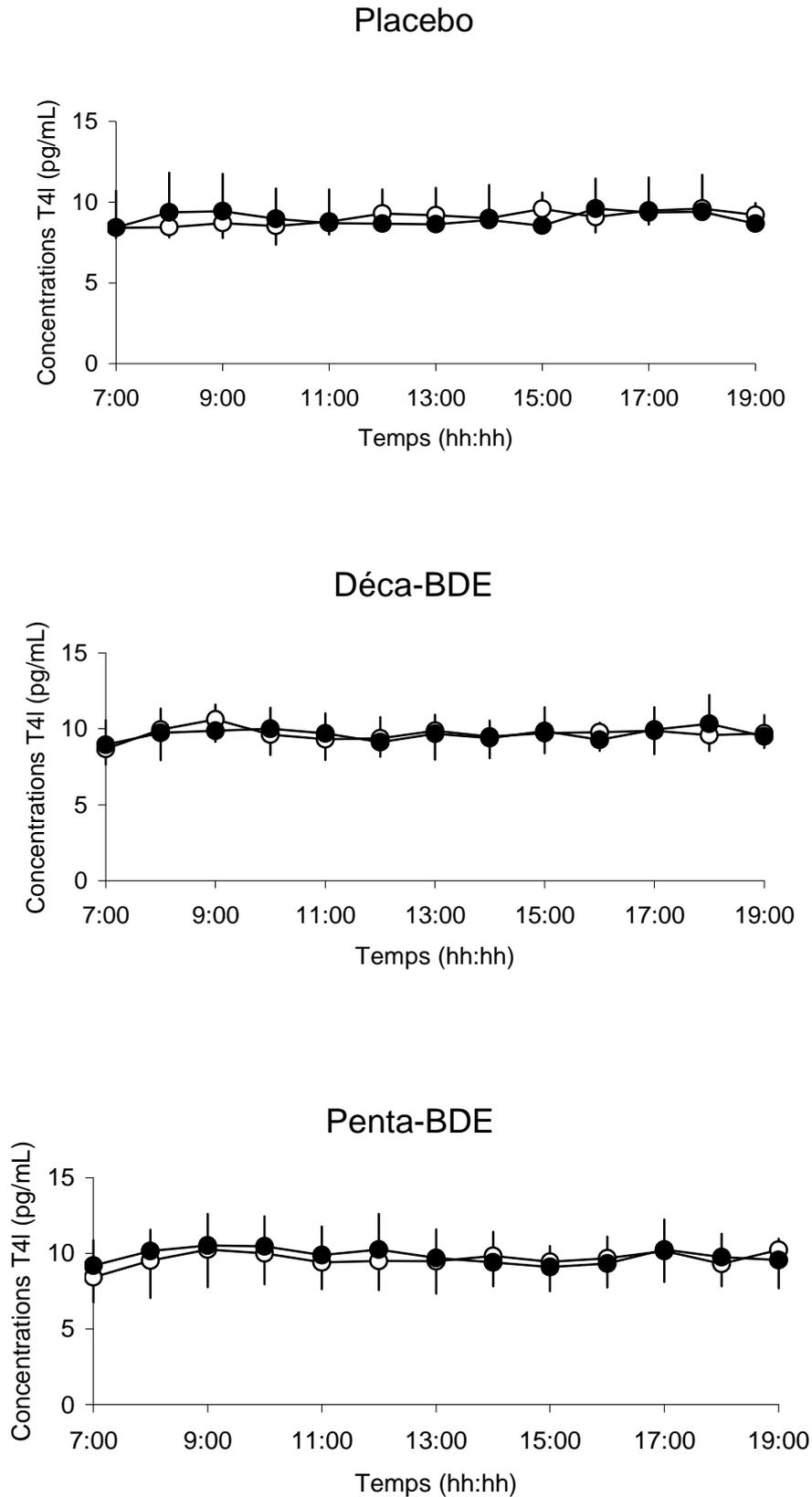


Figure VIII : Profil des concentrations de T4 libre (moyenne \pm ET) avant (symboles blancs) et après (symboles noirs) 28 jours de traitement placebo, déca-BDE et penta-BDE à la dose de 100 ng/kg/j par voie IV

Tableau X : Moyennes et rapports \pm ET des concentrations de T4 et de T3 (libres et totales) avant et après 28 jours de traitement placebo ou PBDE à la dose de 100 ng/kg/j par voie IV

T4 libre (pg/mL)	Avant	Après	Après / Avant
Témoin	9,06 \pm 0,68	9,67 \pm 1,55	1,07 \pm 0,20
Déca-BDE	9,66 \pm 1,03	9,65 \pm 1,36	1,00 \pm 0,06
Penta-BDE	9,62 \pm 1,96	9,80 \pm 1,72	1,03 \pm 0,11

T4 totale (ng/mL)	Avant	Après	Après / Avant
Témoin	65,58 \pm 3,40	72,36 \pm 13,94	1,11 \pm 0,23
Déca-BDE	58,91 \pm 4,54	63,38 \pm 4,82	1,08 \pm 0,10
Penta-BDE	56,64 \pm 8,96	60,89 \pm 8,28	1,08 \pm 0,12

T3 libre (pg/mL)	Avant	Après	Après / Avant
Témoin	2,09 \pm 0,42	2,07 \pm 0,36	1,00 \pm 0,14
Déca-BDE	1,78 \pm 0,15	1,83 \pm 0,10	1,04 \pm 0,14
Penta-BDE	1,64 \pm 0,43	1,71 \pm 0,42	1,05 \pm 0,08

T3 totale (ng/mL)	Avant	Après	Après / Avant
Témoin	0,92 \pm 0,11	0,90 0,19	0,97 \pm 0,16
Déca-BDE	0,84 \pm 0,06	0,86 \pm 0,06	1,02 \pm 0,11
Penta-BDE	0,78 \pm 0,16	0,79 \pm 0,17	1,03 \pm 0,07

II.2.2. Effet des PBDE sur le poids des thyroïdes

La figure IX présente le poids moyen \pm ET des thyroïdes après 28 à 32 jours de traitement placebo ou PBDE à la dose de 100 ng/kg/j par voie IV (respectivement pour le groupe témoin, déca et penta-BDE, $5,28 \pm 1,80$; $5,33 \pm 1,79$ et $6,56 \pm 1,35$ g).

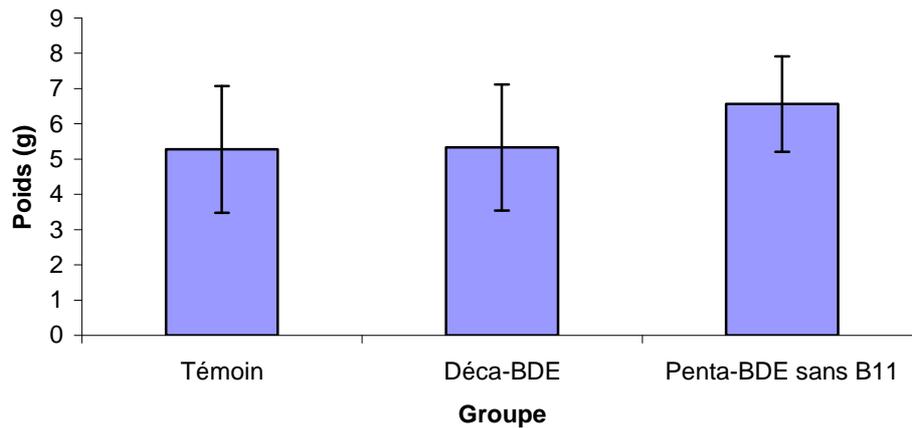


Figure IX : Moyennes \pm ET des poids en gramme des thyroïdes après 28 à 32 jours de traitement placebo ou PBDE à la dose de 100 ng/kg/j par voie IV

Le traitement PBDE n'a pas eu d'influence sur le poids des glandes thyroïdes (ANOVA, $p = 0,47$).

II.3. Effet des PBDE sur la fonction surrénalienne

La figure X présente les profils de concentration de cortisol avant et après 28 jours de traitement placebo ou PBDE à la dose de 100 ng/kg/j par voie intraveineuse.

L'inspection visuelle de cette figure montre qu'il n'y pas eu de variation majeure de concentration de cortisol au cours de la journée chez les brebis et que 28 jours de traitement PBDE n'ont pas eu d'effet sur le profil de concentration de cortisol.

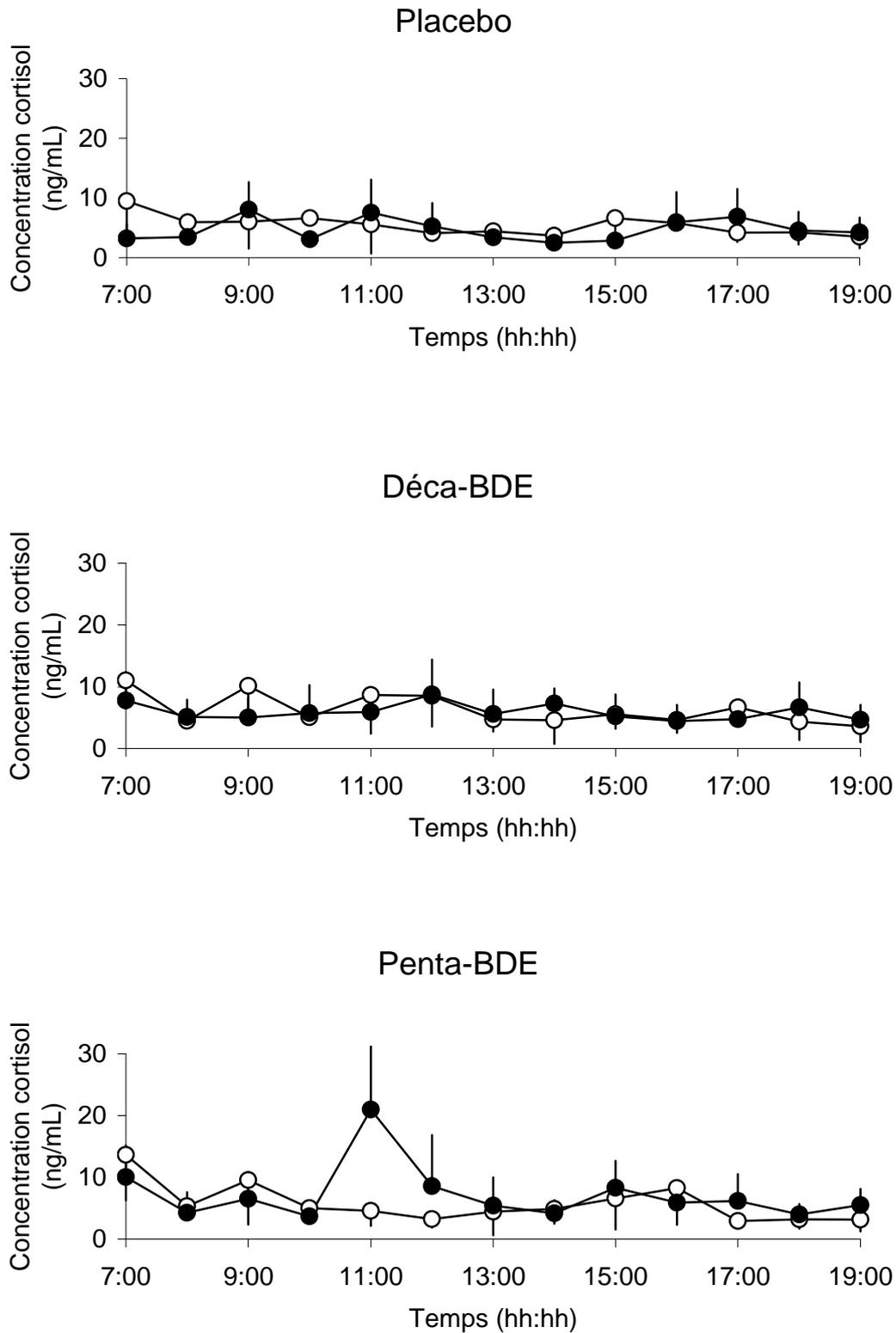


Figure X : Profil des concentrations plasmatiques de cortisol (moyenne \pm ET) avant (symboles blancs) et après (symboles noirs) 28 jours de traitement placebo, déca-BDE et penta-BDE à la dose de 100 ng/kg/j par voie IV

Le tableau XI présente les moyennes des concentrations de cortisol avant et après 28 jours de traitement placebo ou PBDE ainsi que le rapport de ces concentrations moyennes (après / avant) pour chacun des trois groupes. Les traitements PBDE n'ont pas modifié les concentrations de cortisol (ANOVA, $p = 0,270$).

Tableau XI : Moyennes et rapports \pm ET des concentrations du cortisol (ng/mL) avant et après 28 jours de traitement placebo ou PBDE à la dose de 100 ng/kg/j par voie IV

	Avant	Après	Après / Avant
Témoin	5,40 1,25	4,65 \pm 2,43	0,83 \pm 0,27
Déca-BDE	6,34 \pm 1,37	5,96 \pm 2,50	0,92 \pm 0,25
Penta-BDE	5,79 \pm 2,22	7,24 \pm 2,66	1,56 \pm 1,26

Le rapport des concentrations moyennes (après / avant traitement) est relativement élevé pour le groupe penta-BDE. Cela est dû, comme on le voit sur le graphique « penta-BDE » de la figure X, à une valeur anormalement élevée au temps 11h00. En effet, la concentration plasmatique de cortisol d'une brebis (B13) était de 66,11 ng/mL alors que la moyenne de concentration en cortisol de cette brebis sans prendre en compte cette valeur est de $7,36 \pm 6,33$ ng/mL. Cela peut être attribué à un stress excessif de cette brebis à cet instant. L'augmentation du rapport est donc due à un point isolé et n'a pas de valeur biologique. D'ailleurs, le rapport après / avant traitement obtenu sans tenir compte de B13 est de $0,81 \pm 0,53$ ce qui est très proche du rapport des deux autres groupes.

La figure XI présente le poids moyen \pm ET des glandes surrénales après 90 jours de traitement placebo ou PBDE à la dose de 100 ng/kg/j par voie IV (respectivement pour le groupe témoin, déca et penta-BDE, $5,77 \pm 2,02$; $7,55 \pm 3,61$ et $4,83 \pm 1,31$ g).

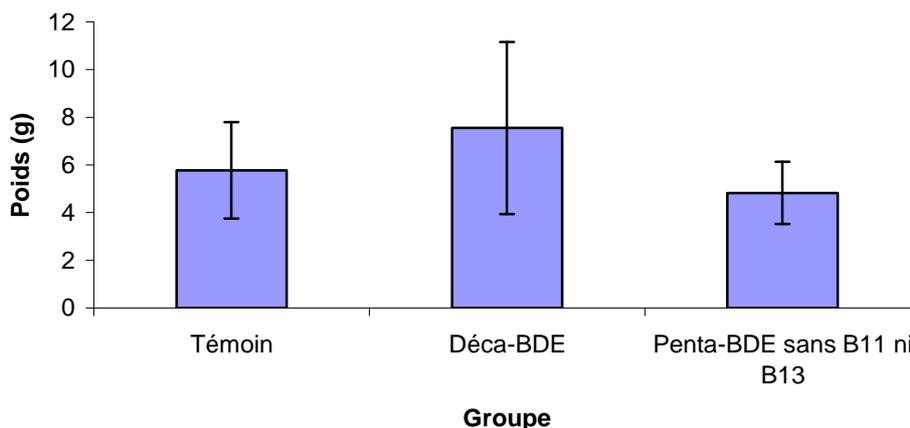


Figure XI : Moyennes \pm ET des poids en gramme des glandes surrénales après 90 jours de traitement placebo ou PBDE à la dose de 100 ng/kg/j par voie IV

Le traitement PBDE n'a pas eu d'influence sur le poids des glandes surrénales (ANOVA, $p = 0,37$).

Notons que dans le groupe traité au déca-BDE, une des brebis (B10) avait des glandes surrénales hypertrophiées par rapport aux autres avec un poids doublé (13,6 g pour une moyenne du poids des glandes surrénales des autres brebis du groupe déca-BDE de $6,03 \pm 1,42$ g).

II.4. Effet des PBDE sur la pharmacocinétique de T4 libre et totale

La pharmacocinétique de T4 a été réalisée sur un modèle de brebis thyroïdectomisée et supplémentée en T3.

Pour vérifier notre modèle euthyroïdien pour T3, les niveaux de concentrations plasmatiques moyennes de T3 totale pendant la supplémentation en T3 ont été évalués à J41, J43 et J46. Le tableau XII présente les concentrations plasmatiques moyennes de T3 totale obtenue au cours du profil, à J28, avant la thyroïdectomie et celles obtenues entre J41 et J46.

Tableau XII : Moyennes \pm ET des concentrations de T3 totale (ng/mL) avant et après thyroïdectomie et supplémentation en T3 à la dose de 3 μ g/kg/j

	Avant thyroïdectomie (J28)	J41-J46
Groupe témoin	$0,92 \pm 0,11$	$0,75 \pm 0,08$
Groupe déca-BDE	$0,84 \pm 0,05$	$0,68 \pm 0,10$
Groupe penta-BDE	$0,78 \pm 0,16$	$0,80 \pm 0,11$

Les concentrations plasmatiques de T3 totale obtenues sur le modèle de brebis thyroïdectomisée supplémentée en T3 sont du même ordre de grandeur que les moyennes de celles dosées à J28 (ANOVA, $p=0,235$), ce qui confirme le modèle euthyroïdien pour T3.

La figure XII illustre l'évolution temporelle des concentrations plasmatiques de T4 totale observées et ajustées au modèle tricompartmental pour une brebis représentative (B1). L'observation visuelle montre que ce modèle permet un bon ajustement des données expérimentales.

Pour la brebis B1, avec le modèle tricompartmental, les données observées ont été ajustées à l'équation triexponentielle (1) : $C(t) = A \exp(-\alpha t) + B \exp(-\beta t) + C \exp(-\gamma t)$

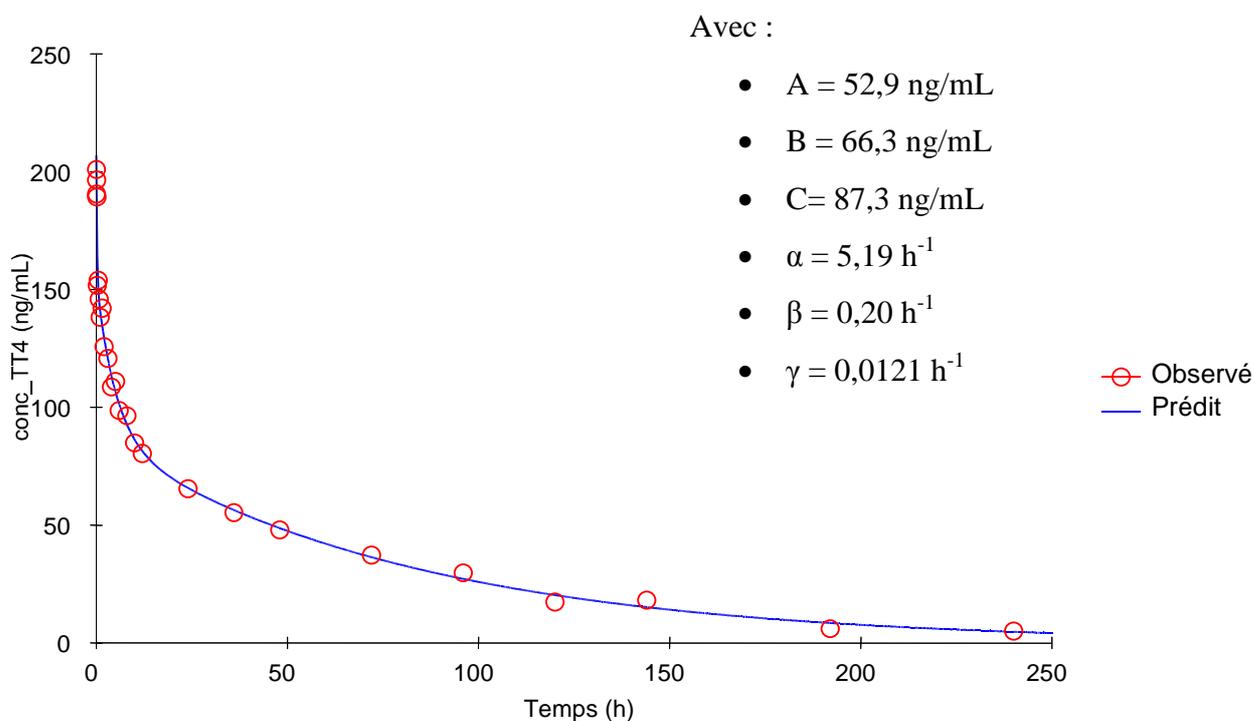


Figure XII : Evolution temporelle des concentrations de T4 totale de la brebis B1 traitée pendant 47 jours avec un plasma placebo et après administration de T4 à la dose de $10 \mu\text{g/kg}$ par voie IV

Les ronds représentent les valeurs observées. La courbe représente les valeurs ajustées au modèle tricompartmental.

La figure XIII représente l'évolution temporelle des concentrations plasmatiques moyennes de T4 libre. L'inspection visuelle de cette figure montre que la décroissance de la T4 libre est relativement similaire dans les trois groupes jusqu'à la 40^{ème} heure après administration puis

la concentration moyenne de T4 libre diminue plus vite en fonction du temps dans le groupe traité au penta-BDE.

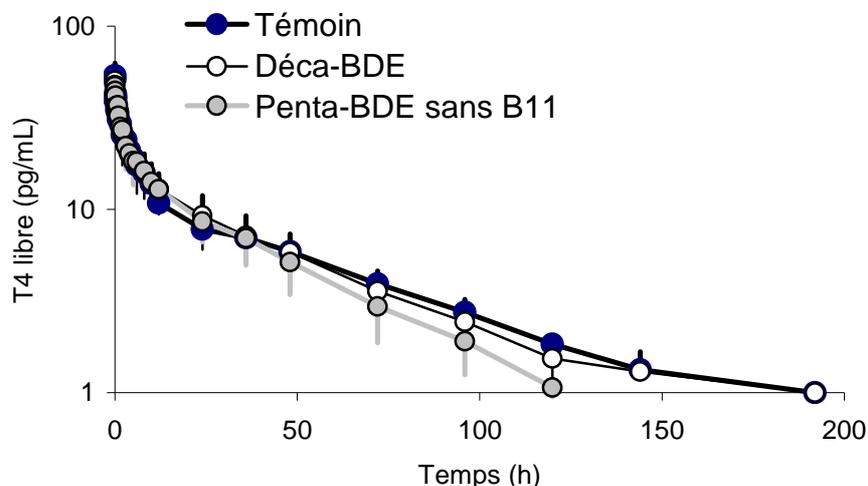


Figure XIII : Evolution temporelle des concentrations moyennes (\pm ET) de T4 libre après une administration par voie IV à la dose de 10 μ g/kg de T4

Les brebis thyroïdectomisées et supplémentées en T3 à la dose de 3 μ g/kg/j par voie sous cutanée, ont reçu pendant 47 jours du solvant (groupe placebo) ou un traitement déca-BDE ou penta-BDE à la dose de 100 ng/kg/j par voie IV.

Le tableau XIII présente les paramètres pharmacocinétiques moyens de la T4 libre pour les trois groupes de brebis. Les PBDE n'ont pas modifié de manière significative l'aire sous la courbe, la clairance et le volume de distribution à l'équilibre. En revanche, le temps de demi-vie et le temps moyen de résidence de la T4 libre sont significativement diminués dans le groupe traité au penta-BDE (moyennes \pm ET, respectivement pour le groupe témoin, déca et penta-BDE, de $42,0 \pm 4,7$; $38,9 \pm 3,2$ et $31,3 \pm 4,0$ h pour le $t_{1/2}$, ANOVA, $p = 0,001$ et de $54,2 \pm 6,8$; $50,7 \pm 4,0$ et $30,9 \pm 15,8$ h pour le MRT, ANOVA, $p = 0,003$).

A noter que le traitement penta-BDE a tendance à diminuer l'aire sous la courbe et le volume de distribution à l'équilibre même si les différences ne sont pas significatives.

La figure XIV représente l'évolution des concentrations plasmatiques moyennes de T4 totale en fonction du temps. L'inspection visuelle de cette figure montre que la décroissance de T4 totale est relativement semblable pour les trois groupes.

Tableau XIII : Paramètres pharmacocinétiques \pm ET de la T4 libre après une administration par voie IV à la dose de 10 μ g/kg de T4

	t1/2 (h)	AUC (pg.h/mL)	Cl (mL/min/kg)	Vss (L/kg)	MRT (h)
Témoin	42,0 \pm 4,7	895,2 \pm 226,8	199 \pm 67	628 \pm 119	54,2 \pm 6,8
Déca-BDE	38,9 \pm 3,2	894,1 \pm 239,8	201 \pm 71	601 \pm 165	50,7 \pm 4,0
Penta-BDE Sans B11	31,3^a \pm 4,0	659,4 \pm 294,0	202 \pm 104	442 \pm 175	30,9^a \pm 15,8

Les brebis thyroïdectomisées et supplémentées en T3 à la dose de 3 μ g/kg/j par voie sous cutanée, ont reçu pendant 47 jours du solvant (groupe placebo) ou un traitement déca-BDE ou penta-BDE à la dose de 100 ng/kg/j par voie IV.

^a : il existe une différence significative entre le groupe témoin et le groupe traité au penta-BDE et entre le groupe traité au déca-BDE et le groupe penta-BDE : t1/2 témoin vs t1/2 penta ; p = 0,002 / t1/2 déca vs t1/2 penta ; p = 0,007 / MRT témoin vs MRT penta ; p = 0,005 / MRT déca vs MRT penta ; p = 0,015

t1/2 : temps de demi-vie

AUC : aire sous la courbe des concentrations plasmatiques de T4 libre

Cl : clairance plasmatique

Vss : volume de distribution à l'équilibre

MRT : temps moyen de résidence

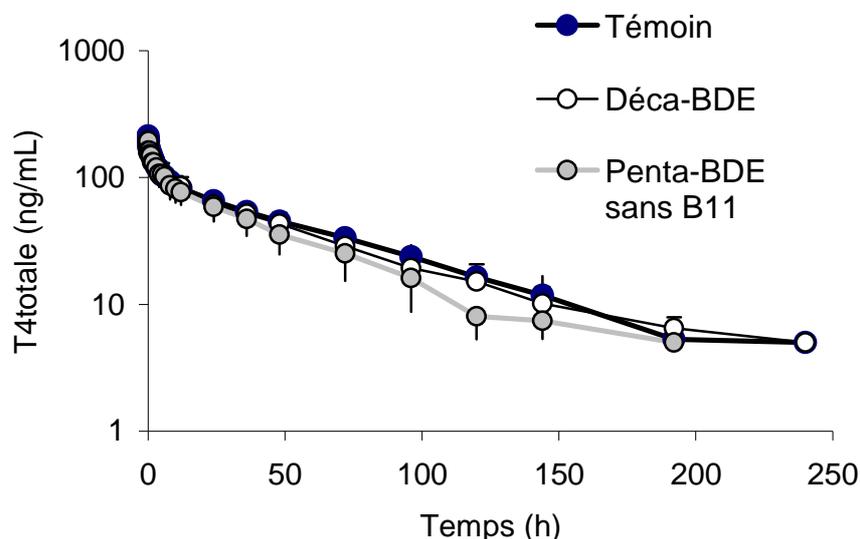


Figure XIV : Evolution temporelle des concentrations moyennes (\pm ET) de T4 totale après une administration par voie IV à la dose de 10 μ g/kg de T4

Les brebis thyroïdectomisées et supplémentées en T3 à la dose de 3 μ g/kg/j par voie sous cutanée, ont reçu pendant 47 jours du solvant (groupe placebo) ou un traitement déca-BDE ou penta-BDE à la dose de 100 ng/kg/j par voie IV.

Le tableau XIV présente les paramètres pharmacocinétiques moyens de T4 totale pour les trois groupes de brebis. Aucun des deux traitements PBDE n'a eu d'influence significative sur les paramètres pharmacocinétiques de T4 totale.

Cependant, le penta-BDE tend à diminuer le temps de demi-vie (ANOVA, $p = 0,084$ avec témoin vs penta : $p = 0,150$ et déca vs penta : $p = 0,157$) et le temps moyen de résidence (ANOVA, $p = 0,077$ avec témoin vs penta : $p = 0,122$ et déca vs penta : $p = 0,170$) avec des moyennes \pm ET respectivement pour le groupe témoin, déca et penta-BDE de $48,1 \pm 5,9$; $47,4 \pm 8,0$ et $38,0 \pm 6,7$ h pour le temps de demi-vie et de $66,1 \pm 8,5$; $64,1 \pm 10,2$ et $42,4 \pm 19,8$ h pour le temps moyen de résidence.

Tableau XIV : Paramètres pharmacocinétiques \pm ET de la T4 totale après une administration par voie IV à la dose de $10 \mu\text{g/kg}$ de T4

	t1/2 (h)	AUC (ng.h/mL)	Cl (mL/min/kg)	Vss (L/kg)	MRT (h)
Témoin	$48,1 \pm 5,9$	$6721,7 \pm 1120,4$	$0,025 \pm 0,005$	$0,100 \pm 0,013$	$66,1 \pm 8,5$
Déca-BDE	$47,4 \pm 8,0$	$6342,8 \pm 1515,7$	$0,028 \pm 0,009$	$0,104 \pm 0,018$	$64,1 \pm 10,2$
Penta-BDE	$38,0 \pm 6,7$	$4481,3 \pm 2084,6$	$0,030 \pm 0,016$	$0,084 \pm 0,041$	$42,4 \pm 19,8$
Sans B11					

Les brebis thyroïdectomisées et supplémentées en T3 à la dose de $3 \mu\text{g/kg/j}$ par voie sous cutanée, ont reçu pendant 47 jours du solvant (groupe placebo) ou un traitement déca-BDE ou penta-BDE à la dose de 100ng/kg/j par voie IV.

t1/2 : temps de demi-vie

AUC : aire sous la courbe des concentrations plasmatiques de T4 totale

Cl : clairance plasmatique

Vss : volume de distribution à l'équilibre

MRT : temps moyen de résidence

II. 5. Effet des PBDE sur la liaison de T3 aux protéines plasmatiques

II.5.1. Etudes *in vitro*

Pour vérifier l'absence d'interférence des PBDE sur le dosage radioimmunologique de T3 (totale et libre), les concentrations de T3 ont été mesurées en présence de concentrations croissantes de déca-BDE et de penta-BDE sur un pool de plasma (figures XV et XVI respectivement pour les concentrations de T3 totale et de T3 libre).

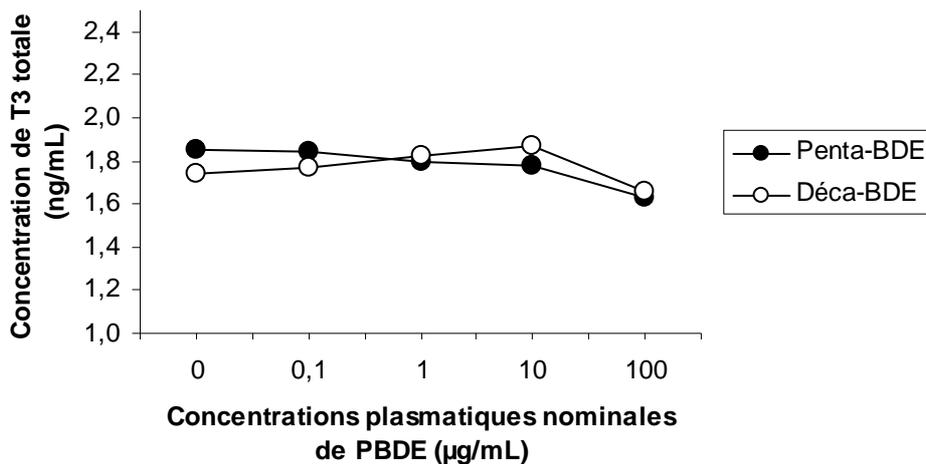


Figure XV : Concentrations de T3 totale en fonction de concentrations plasmatiques croissantes de penta-BDE et de déca-BDE

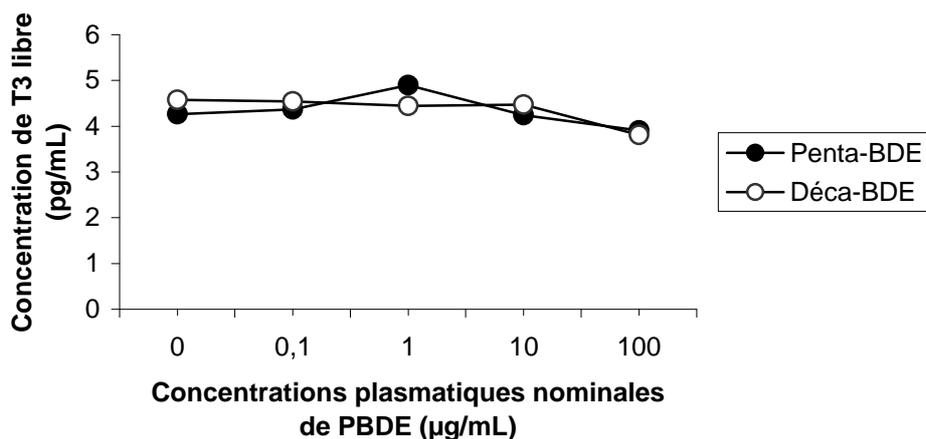


Figure XVI : Concentrations de T3 libre en fonction de concentrations plasmatiques croissantes de penta-BDE et de déca-BDE – dosage radioimmunologique

L'inspection visuelle de ces figures montre que les concentrations de T3 totale et de T3 libre ne sont pas modifiées par les PBDE *in vitro*, ce qui suggère que les PBDE n'interfèrent pas avec le dosage radioimmunologique de T3 (totale et libre).

Pour évaluer la capacité des PBDE à déplacer la T3 de ses protéines plasmatiques, un pool de plasma a été dialysé. La figure XVII représente la concentration de T3 libre déterminée par dialyse à l'équilibre en fonction de concentrations croissantes de PBDE ajoutés à un pool de plasma déthyroïdé de brebis surchargé en T3 à la concentration de 5 ng/mL.

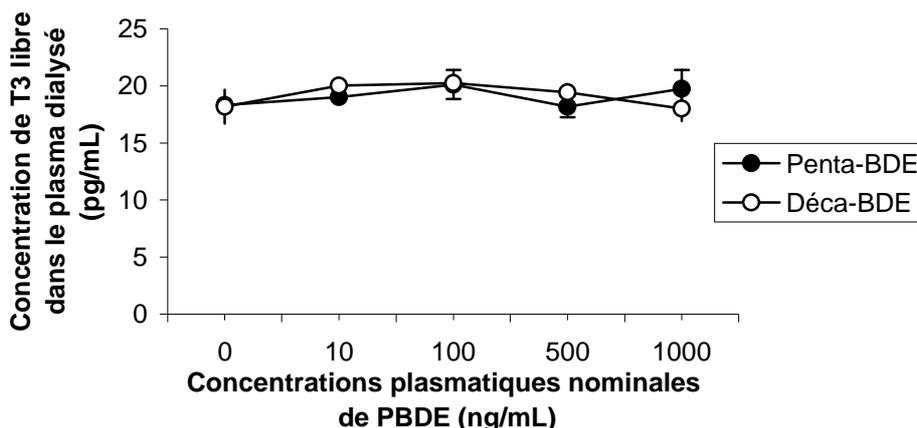


Figure XVII : Moyennes \pm ET des concentrations de T3 libre en fonction de concentrations plasmatiques croissantes de penta-BDE et de déca-BDE – dosage par dialyse à l'équilibre

L'inspection visuelle de cette figure ne montre pas de modification de la concentration de T3 libre quelque soit la dose de PBDE.

Ces deux approches montrent que les PBDE n'ont pas d'effet sur la liaison de la T3 aux protéines plasmatiques *in vitro*.

II.5.2. Etudes *in vivo*

Le tableau XV présente les pourcentages moyens de T3 libre évalués par dialyse à l'équilibre avant et après 28 jours de traitement PBDE ou placebo chez les brebis.

Tableau XV : Moyenne \pm ET des pourcentages de T3 libre avant et après 28 jours de traitement placebo ou PBDE

	Avant	Après
Témoin	0,38 \pm 0,04	0,38 \pm 0,06
Déca-BDE	0,38 \pm 0,03	0,41 \pm 0,04
Penta-BDE	0,41 \pm 0,05	0,38 \pm 0,03

Le pourcentage de T3 libre est pratiquement constant quelque soit le groupe, ce qui signifie que le traitement PBDE administré aux brebis n'altère pas la liaison de T3 aux protéines plasmatiques.

A titre d'essai, afin de confirmer cette observation, les paramètres de liaison de T3 aux protéines plasmatiques ont été déterminés par dialyse à l'équilibre avant et après 28 jours de traitement PBDE sur 2 brebis du groupe penta-BDE et 2 du groupe déca-BDE. Leur plasma a

été déthyroïdé. La constante de dissociation à l'équilibre du complexe TBG-T3, la capacité maximale de liaison de T3 à la TBG et la constante de liaison non spécifique de T3 à la TTR et à l'albumine présentent chez les 4 brebis de grandes variations (tableau XVI). Il est difficile de conclure étant donné le nombre limité de brebis de cet essai.

Tableau XVI : Moyennes \pm ET de la constante de dissociation à l'équilibre de TBG-T3 (ng/mL), de la capacité maximale de liaison de T3 à la TBG (ng/mL) et de la constante de liaison non spécifique de T3 à la TTR et à l'albumine avant et après 28 jours de traitement déca-BDE ou penta-BDE

	Déca-BDE Avant	Déca-BDE Après	Penta-BDE Avant	Penta-BDE Après
Kd	1,69 \pm 0,45	0,78 \pm 0,26	0,52 \pm 0,10	0,76 \pm 0,41
Bmax	200 \pm 1	91,1 \pm 26,7	85,6 \pm 19,0	145 \pm 77
NS	94,8 \pm 54,0	106 \pm 53	164 \pm 6	140 \pm 18

Cette étude a été réalisée sur 2 brebis de chaque groupe : B6 et B7 pour le groupe déca-BDE et B11 et B12 pour le groupe penta-BDE

Leur plasma a été déthyroïdé.

Avant : avant 28 jours de traitement à la dose de 100 ng/kg/j par voie IV

Après : après 28 jours de traitement à la dose de 100 ng/kg/j par voie IV

Kd : constante de dissociation à l'équilibre du complexe TBG-T3

Bmax : capacité maximale de liaison de T3 à la TBG

NS : constante de liaison non spécifique de T3 à la TTR (Transthyrétine) et à l'albumine

Les paramètres de liaison de T3 aux protéines plasmatiques ont été déterminés par dialyse à l'équilibre sur les 14 brebis traitées pendant 39-46 jours aux PBDE, thyroïdectomisées et supplémentées en T3. La figure XVIII illustre la relation entre les concentrations de la T3 liée aux protéines plasmatiques et celles de la T3 libre pour une brebis représentative de chacun des groupes (B5 pour le groupe témoin, B10 pour le groupe déca-BDE et B12 pour le groupe penta-BDE).

L'inspection visuelle de cette figure montre que les trois courbes sont très proches et que le modèle permet un bon ajustement des données expérimentales.

Les données observées ont été ajustées à l'équation (15) : $B = (B_{max} \times F) / (Kd + F) + NS \times F$

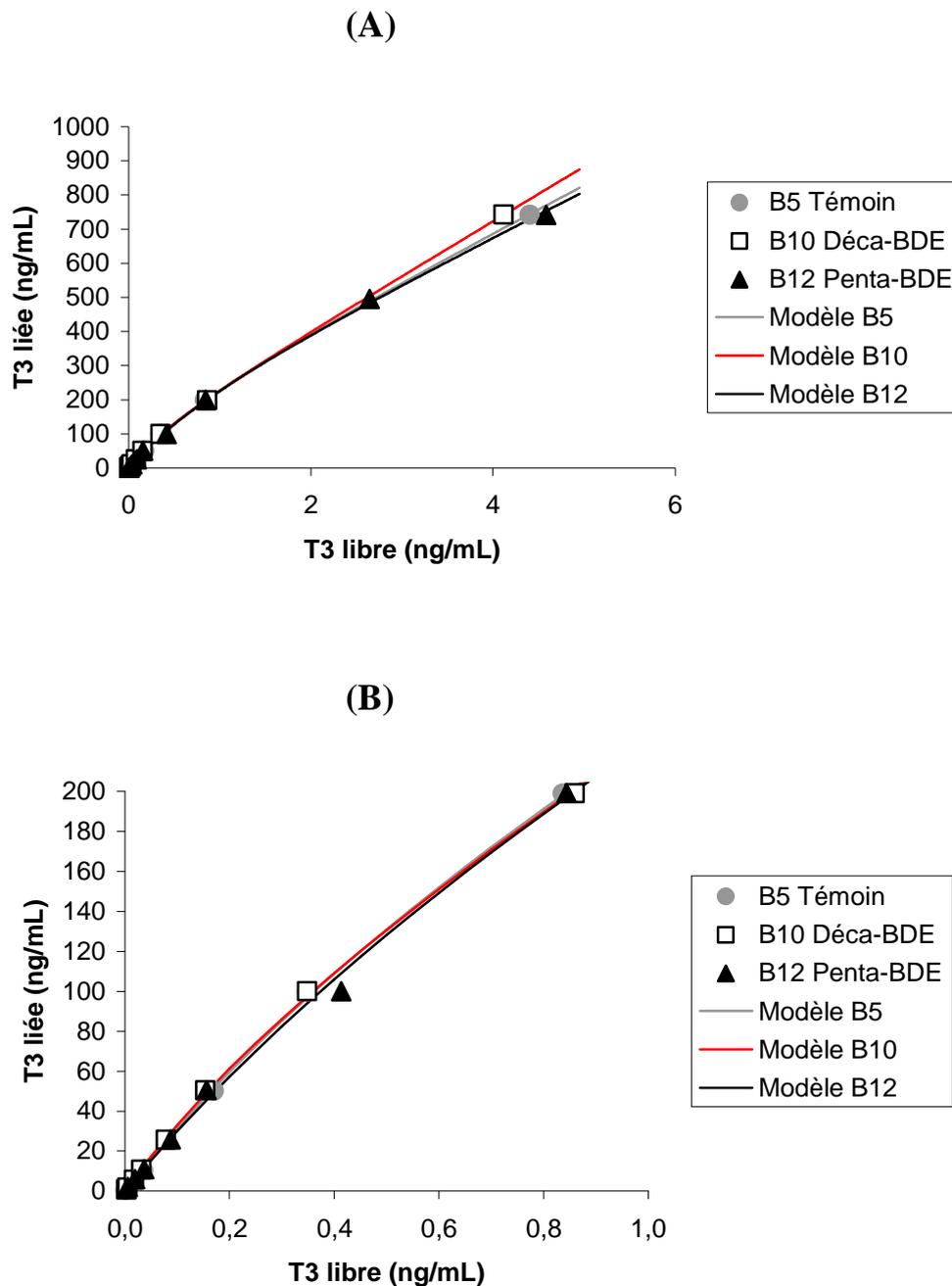


Figure XVIII : Concentrations de T3 liée aux protéines plasmatiques en fonction des concentrations de T3 libre des brebis B5 (témoin), B10 (déca-BDE) et B12 (penta-BDE) Les brebis ont été thyroïdectomisées et supplémentées en T3 à la dose de 3 μ g/kg par voie SC et ont reçu pendant 39-46 jours une dose de 100 ng/kg/j de traitement placebo ou PBDE par voie IV.

Les points représentent les valeurs observées.
 Les courbes représentent les valeurs ajustées avec :

	B5	B10	B12
Kd	0,836	0,488	1,07
Bmax	167	102	200
NS	137	158	129

(A) : gamme de concentration en T3 liée allant de 0,5 à 1000 ng/mL
 (B) : gamme de concentration en T3 liée allant de 0,5 à 200 ng/mL

Le tableau XVII présente les moyennes \pm ET de la constante de dissociation à l'équilibre du complexe TBG-T3, de la capacité maximale de liaison de T3 à la TBG et de la constante de liaison non spécifique de T3 à la TTR et à l'albumine des 3 groupes. Il n'y a pas de différence significative (ANOVA respectivement pour Kd, Bmax et NS : $p = 0,155$, $p = 0,968$ et $p = 0,560$).

Tableau XVII : Moyennes \pm ET de la constante de dissociation à l'équilibre de TBG-T3 (ng/mL), de la capacité maximale de liaison de T3 à la TBG (ng/mL) et de la constante de liaison non spécifique de T3 à la TTR et à l'albumine après 39-46 jours de traitement placebo ou PBDE à la dose de 100 ng/kg/j par voie IV

	Témoin	Déca-BDE	Penta-BDE
Kd	0,556 \pm 0,191	0,781 \pm 0,263	0,896 \pm 0,221
Bmax	120 \pm 32	119 \pm 38	126 \pm 50
NS	135 \pm 7	137 \pm 24	148 \pm 16

Les brebis ont été thyroïdectomisées et supplémentées en T3 à la dose de 3 μ g/kg/j par voie sous cutanée.

Kd : constante de dissociation à l'équilibre du complexe TBG-T3

Bmax : capacité maximale de liaison de T3 à la TBG

NS : constante de liaison non spécifique de T3 à la TTR (Transthyréline) et à l'albumine

A noter que le traitement penta-BDE a tendance à augmenter la constante de dissociation à l'équilibre du complexe TBG-T3 comparativement au groupe contrôle même si la différence n'est pas significative (ANOVA, $p = 0,155$).

L'ensemble de ces expériences *in vivo* montre que le traitement PBDE à la dose de 100 ng/kg/j pendant 28 ou 46 jours n'altère pas la liaison de T3 à ses protéines plasmatiques de transport.

III. Discussion

L'objectif de notre étude était d'évaluer l'effet perturbateur thyroïdien potentiel des PBDE sur un modèle ovin.

Les concentrations moyennes de T3 et T4 (libres et totales) ainsi que les poids des thyroïdes n'ont pas été modifiés par un traitement pendant 28 jours au déca-BDE ou au penta-BDE à la dose de 100 ng/kg/j. Sur un modèle de brebis thyroïdectomisées et euthyroïdien pour la T3, un traitement au penta-BDE entraîne une diminution du temps de demi-vie de la T4 libre de 24% et de son temps moyen de résidence de 43%, alors que les paramètres pharmacocinétiques de la T4 totale n'ont pas été modifiés par les PBDE.

Notre étude a également mis en évidence, après un traitement penta-BDE de trois mois, la présence d'excroissances hypophysaires sur les trois brebis traitées au penta-BDE.

Par ailleurs, dans notre étude, les PBDE n'altèrent pas la liaison de T3 avec les protéines plasmatiques. De plus, le traitement aux PBDE n'a pas eu d'influence sur les profils de concentration plasmatique de cortisol chez les brebis, suggérant qu'il n'existe pas de profondes altérations de la fonction corticosurrénalienne.

L'ensemble de ces résultats met en évidence le potentiel perturbateur thyroïdien du penta-BDE chez le mouton, une espèce pertinente vis-à-vis de l'homme pour la régulation de la fonction thyroïdienne.

Pertinence du modèle

La majorité des études toxicologiques sont réalisées sur des espèces rongeurs. Toutefois, les études sur la toxicité thyroïdienne sont difficilement extrapolables à l'homme. En effet, le rat n'exprime pas la TBG, qui constitue la principale protéine de transport des hormones thyroïdiennes chez l'homme et les ovins (tableau III, Degroot, 1989). Or, seule la fraction libre des hormones thyroïdiennes est soumise au métabolisme. Les protéines de transport jouent un rôle essentiel dans l'homéostasie de la fonction thyroïdienne en protégeant les hormones thyroïdiennes du métabolisme. C'est la raison pour laquelle, le modèle ovin est plus adapté pour les études de toxicité thyroïdienne que le rat.

Le tableau XVIII compare les concentrations plasmatiques et les clairances de T4 totale chez l'homme, la brebis et le rat, ce qui illustre la pertinence du modèle choisi. La clairance élevée

de la T4 totale chez le rat est cohérente avec l'absence de TBG chez cette espèce alors que les clairances de T4 totale de l'homme et de la brebis sont plus faibles et similaires.

Tableau XVIII : Comparaison des clairances et des concentrations plasmatiques de T4 totale chez l'homme, la brebis et le rat

	Clairance de T4 totale (mL/min/kg)	Concentration de T4 totale (ng/mL)
Homme	0,009 (Chopra, 1976)	86 ± 5 (Chopra, 1976)
Brebis	0,042 ± 0,007 (De Pablo-Davila, 1980, n = 5)	60,7 ± 5,2 (Dahl, 1994, n = 8)
Rat	0,157 ± 0,020 (Yamada, 1996)	22 (Hallgren, 2002)

Par ailleurs, dans la majorité des études toxicologiques, les sujets reçoivent des doses élevées et sur des périodes relativement courtes, qui ne permettent pas de reproduire véritablement l'exposition quotidienne observée chez l'homme. La source principale d'exposition est la nourriture, la dose journalière est estimée entre 44 et 51 ng/j (Gill, 2004), soit pour un homme de 70 kg une dose comprise entre 0,63 et 0,73 ng/kg/j. L'exposition du nouveau-né via le lait maternel a été déterminée récemment en France et s'élève à 40 ng/j (Antignac, 2009), soit environ 10 ng/kg/j. Dans notre étude, la dose de PBDE est relativement faible, dix fois supérieure à celle estimée chez les nourrissons, soit 100 ng/kg/j et elle est pertinente pour évaluer le risque perturbateur endocrinien des PBDE vis-à-vis de l'homme.

Notre étude, contrairement à d'autres études, n'a pas permis de mettre en évidence de dysfonctionnement de la fonction thyroïdienne au travers des modifications des concentrations en hormones thyroïdiennes (Tseng, 2007 ; Kuriyama, 2007 ; Stoker, 2004 ; Hallgren, 2002 chez les rongeurs, Kuiper, 2008 ; Fernie, 2005 ; Tomy, 2004 chez les poissons et les oiseaux). La différence entre les doses de PBDE peut en partie expliquer la divergence entre les études. Des effets des PBDE sur les concentrations en hormones thyroïdiennes sont généralement observés à des doses plus élevées. Ainsi, une diminution des concentrations plasmatiques de T4 libre a été observée chez des souris ayant reçu pendant 14 jours 18 mg/kg de tétra-BDE par voie orale, soit une dose 180000 fois supérieure à celle que nous avons utilisée (Hallgren, 2002). De la même façon, un effet perturbateur thyroïdien du penta-BDE a été mis en évidence par Kuriyama en 2007, avec des doses de 60 et 300 µg/kg

en administration unique par voie orale (soit pour des doses 600 à 3000 fois plus élevées que les nôtres). Cette étude a été réalisée sur des rates gravides recevant une administration de penta-BDE au 6^{ème} jour de gestation. Une diminution des concentrations de T3 et de T4 (totales et libres) à la fois chez les mères et chez les ratons a été observée aux temps J1 et J22 post-natal. Notons cependant que dans ces études, l'administration a été réalisée par voie orale alors que dans notre expérience, l'administration était intraveineuse. Cette voie a été utilisée pour éviter tout problème éventuel de biodisponibilité par voie orale chez les ruminants. Pour comparer ces différents modèles, il serait nécessaire de connaître l'exposition des animaux à travers les concentrations plasmatiques de PBDE. Les concentrations de penta-BDE mesurées dans le tissu adipeux de ces rates le jour de la mise bas étaient de 4,1 (rates ayant reçu 60 µg/kg de penta-BDE) à 30 fois plus élevées (rates ayant reçu 300 µg/kg de penta-BDE) que celles mesurées chez l'homme. Dans notre étude, les concentrations plasmatiques de PBDE des brebis, au cours de la période de traitement de 48 jours, n'ont pas encore été mesurées au moment de la rédaction de ce manuscrit.

Effet des PBDE sur la fonction surrénalienne

Les PBDE s'accumulent dans les glandes surrénales. Soixante douze heures après l'administration d'une dose unique de 2,9 mg/kg de déca-BDE par voie orale chez le rat, on retrouve dans les glandes surrénales 4,6 µg de déca-BDE par gramme de lipides (Mörck, 2003).

Cependant, nous n'avons pas observé d'effet des PBDE sur les concentrations de cortisol. Les concentrations de cortisol ont été augmentées chez des souris traitées par voie orale pendant 14 jours avec des doses croissantes de 250, 500 ou 1000 mg/kg/j de penta-BDE (Fowles, 1994). Cependant, cette augmentation suit l'ordre des euthanasies ce qui suggère l'intervention du stress.

En accord avec nos résultats, différentes études ont conclu à une absence d'effet des PBDE sur le poids des glandes surrénales de rats après une exposition post natale par voie orale de DE-71 (mélange de PBDE majoritairement composé de penta-BDE et de tétra-BDE) aux doses de 3, 30 ou 60 mg/kg/j (Stoker, 2004).

Effet des PBDE sur la fonction thyroïdienne

Dans notre étude, aucun effet des PBDE n'a été observé ni sur le poids des thyroïdes ni sur celui des hypophyses. L'étude de Stoker en 2004, décrite ci-dessus, confirme nos résultats.

Dans notre étude, les hypophyses du groupe traité pendant 90 jours au penta-BDE présentaient des excroissances. Cependant, la méthode de dissection des différents organes n'a pas été standardisée et le tissu conjonctif entourant les hypophyses pourrait constituer une source de variation de leur poids. Par ailleurs, le nombre d'individus était relativement limité (3 brebis dans le groupe penta-BDE après 90 jours de traitement). Une analyse anatomopathologique pourrait permettre d'approfondir la nature de ces excroissances. Toutefois, à notre connaissance, il n'est pas rapporté dans la littérature des cas d'excroissances hypophysaires suite à des administrations de PBDE.

Dans notre étude, il est difficile de conclure à l'absence d'effet des PBDE sur les concentrations de TSH car notre méthode de dosage radioimmunologique n'était pas assez sensible. En effet, les concentrations plasmatiques de TSH chez la brebis sont de l'ordre de 0,1 ng/mL (Dahl, 1994) correspondant à la LOQ de notre dosage. Cependant, nos résultats suggèrent que les PBDE à des doses quotidiennes faibles n'augmentent pas de manière importante la TSH car les concentrations après 28 jours de traitement aux PBDE restent proches de la LOQ. Pour confirmer ce résultat, il serait nécessaire d'améliorer la sensibilité de notre technique de dosage.

D'autres études ont montré un effet des PBDE sur les concentrations plasmatiques de TSH. Ainsi, une administration post natale par voie orale de DE-71 (mélange de PBDE majoritairement composé de penta-BDE et de tétra-BDE) à des doses de 30 ou 60 mg/kg/j à de jeunes rats mâles, entraîne une augmentation de la TSH au 31^{ème} jour d'exposition (Stoker, 2004).

Une étude épidémiologique réalisée sur 308 américains montre que l'exposition aux PBDE (concentration de PBDE dans le sérum : 69,9 ng/g de lipides) est associée à une diminution de la concentration plasmatique de TSH (Turyk, 2008). Toutefois, une autre étude comparant 49 personnes vivant près d'une usine de traitement des déchets électroniques (concentration de PBDE dans le sérum : 382 ng/g de lipides) à 50 personnes vivant à 50 km de cette usine (concentration de PBDE dans le sérum : 158 ng/g de lipides) montre, au contraire, une corrélation entre l'augmentation de la concentration de PBDE dans le sérum et l'augmentation de la concentration plasmatique de TSH (1,79 μ UI/mL vs 1,15 μ UI/mL) (Yuan, 2008). Il

serait nécessaire de connaître l'exposition réelle de nos brebis aux PBDE pour comparer nos résultats à ceux de ces études.

Dans notre étude, nous n'avons pas observé d'effet des PBDE sur le profil des concentrations plasmatiques de T3 et de T4 (libres et totales).

Les concentrations en hormones libres présentent l'avantage de ne pas être influencées par les variations de concentration des protéines de transport ou de leur capacité de liaison. En outre, l'effet potentiel des PBDE sur la fraction libre n'entraîne pas obligatoirement un effet sur les concentrations totales. En effet, la fraction de T4 libre ne représentant que 0,02% (De Pablo-Davila, 1980 et Yokus, 1960) de T4 totale, une modification de T4 libre n'est pas suffisante pour pouvoir avoir des répercussions sur la T4 totale.

Les valeurs des concentrations plasmatiques des hormones thyroïdiennes observées sur les 15 brebis de notre étude avant traitement sont du même ordre de grandeur que les valeurs physiologiques (tableau XIX). Les dosages de T4 totale ont été validés pour le plasma ovin, alors qu'il n'existe pas de dosage des hormones libres validé chez les ovins.

Tableau XIX : Comparaison des concentrations plasmatiques des hormones thyroïdiennes chez la brebis

	Yokus, 2006 (n = 12)	De Pablo-Davila, 1980 (n = 5)	Dahl, 1994 (n = 8)	Notre étude J-1 (n = 15)
T3 totale (ng/mL)	1,27 ± 0,45	1,02 ± 0,56		0,845 ± 0,125
T3 libre (pg/mL)	2,5 ± 0,6			1,79 ± 0,38
T4 totale (ng/mL)	54,7 ± 12,6	58,4 ± 15,8	60,7 ± 5,2	59,3 ± 7,2
T4 libre (pg/mL)	11,4 ± 2,4			9,44 ± 1,26

Les concentrations relativement faibles de T3 dans notre étude pourraient être liées à un effet saison. L'ensemble de l'étude a été réalisé de mars à mai. Or, l'activité de la désiodase de type II est plus faible pendant les jours longs comparativement aux jours courts d'où une diminution de la production de T3 (Yasuo, 2006, étude menée sur des chèvres). Cela expliquerait la différence de concentration de T3 totale entre notre étude et celle de Yokus réalisée sur une année entière.

D'une manière générale, dans la littérature, (tableau XX, études menées sur des rongeurs), les PBDE entraînent une diminution des concentrations plasmatiques des hormones thyroïdiennes y compris chez des espèces non mammifères (Poissons : Kuiper, 2008 chez les flets et les

darios zébrés et Tomy, 2004 chez les truites ; Oiseaux : Fernie, 2005 chez les faucons crécerelles).

Tableau XX : Effets des PBDE sur la fonction thyroïdienne des rongeurs selon différentes études

Espèces	Modalités de traitement	Effets observés	Références
Rat Femelle	Tétra-BDE par VO 18 mg/kg/j pendant 14 jours	Diminution de 30% de la liaison de T4 à la TTR à J15 Diminution de la concentration de T4 libre à J15	Hallgren, 2002
Jeunes rats Femelles Mâles	DE-71 par VO 3, 30 ou 60 mg/kg/j Du 22 ^{ème} (J1) au 41 ^{ème} jour post natal Du 23 ^{ème} (J1) au 53 ^{ème} jour post natal	Diminution de la concentration de : - T4 totale à J5 et J20 pour les doses de 30 et 60 mg/kg/j - T4 totale à J31 pour la dose de 3 mg/kg/j - T4 totale à J5 et J31 pour les doses de 30 et 60 mg/kg/j - T3 totale à J31 pour les doses de 30 et 60 mg/kg/j	Stoker, 2004
Souris gravides	Déca-BDE par VO 10 ou 1500 mg/kg/j pendant les 17 premiers jours de gestation	Diminution de la concentration de T3 totale chez les mâles des portées	Tseng, 2007
Rates gravides	Penta-BDE par VO 60 ou 300 µg/kg en administration unique au 6 ^{ème} jour de gestation	Diminution des concentrations de T3 et de T4 (libres et totales) chez les mères et les portées à J1 et J22 post natal	Kuriyama, 2007

VO : voie orale

TTR : Transthyréline

DE-71 : mélange de PBDE majoritairement composé de penta-BDE et de tétra-BDE

Chez l'homme, actuellement, les études épidémiologiques concernant les effets des PBDE sur la fonction thyroïdienne sont rares et divergentes. Une étude américaine sur 308 sujets (Turyk, 2008), montre que l'exposition aux PBDE est corrélée à une diminution des concentrations plasmatiques de T3 totale associée à une augmentation de celles de T4 (totale et libre), ce qui est différent des résultats obtenus dans la plupart des modèles rongeurs.

Une autre étude épidémiologique réalisée chez l'homme montre une absence d'effet des PBDE (concentration en PBDE dans le sérum : 15 ng/g de lipides, inférieure à l'étude

précédente : 69 ng/g de lipides) sur la concentration de T4 libre (Bloom, 2008). Ces résultats sont cohérents avec notre étude sur le modèle mouton.

Les études sur les rongeurs utilisent des doses d'exposition plus élevées et des sujets à des stades de vie plus jeunes, ce qui peut expliquer les différences observées entre l'homme et les rongeurs.

Dans notre étude, l'absence d'effet des PBDE sur les concentrations plasmatiques des hormones thyroïdiennes pourrait s'expliquer en partie par des phénomènes compensateurs soit périphériques soit au niveau du système nerveux central.

En effet, la T4, sous l'effet des désiodases se transforme en T3 dans différents compartiments périphériques de l'organisme ce qui modifie les concentrations plasmatiques des hormones thyroïdiennes et dissimule les modifications de concentrations engendrées par un perturbateur thyroïdien.

De plus, il existe des phénomènes compensateurs centraux, au niveau du rétrocontrôle négatif exercé par T3 et T4 sur l'hypothalamus et l'hypophyse. Ainsi, une augmentation de l'élimination des hormones thyroïdiennes par les PBDE entraîne une stimulation de l'hypothalamus d'où une sécrétion de TRH, stimulant à son tour l'hypophyse sécrétant la TSH qui, enfin, entraîne une augmentation de synthèse de T3 et de T4 au niveau de la thyroïde (figure IV). Ces phénomènes compensateurs ont été décrits chez le rat pour un autre perturbateur thyroïdien, le fipronil. Avec ce pesticide, le peu d'effet sur les concentrations plasmatiques des hormones thyroïdiennes (diminution de 23 à 26%), comparativement à la forte augmentation de la clairance de T4 (de 236 à 250%), est probablement dû à une augmentation de la sécrétion de T3 et de T4 compensant l'augmentation de leur élimination (Leghait, 2009).

Effet des PBDE sur la liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines plasmatiques

Les PBDE, de part leur analogie structurale avec les hormones thyroïdiennes sont des inhibiteurs compétitifs potentiels de la liaison de T3 et de T4 aux protéines plasmatiques.

Etudes in vitro

Dans une première étude *in vitro*, des doses croissantes de PBDE ajoutées à du plasma de brebis n'ont pas modifié les concentrations de T3 (libre et totale). Ce résultat a été observé avec deux méthodes : dosages radioimmunologiques de T3 libre et de T3 totale (doses élevées

de PBDE jusqu'à 100 µg/mL) et la dialyse à l'équilibre (doses jusqu'à 1000 ng/mL). Les PBDE non métabolisés, n'interfèrent donc pas avec la liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines de transport *in vitro*. Toutefois, l'étude de Meerts en 2000 démontre que ce sont les métabolites hydroxylés des PBDE qui se lient à la transthyrétine humaine, avec une affinité plus importante pour les PBDE moins bromés. Les milieux issus de l'incubation de microsomes hépatiques (1 mg/mL) avec des penta-BDE et des tétra-BDE (10 µmol/mL), diminuent de 60% la liaison de T4 à la transthyrétine. Sur notre modèle, il serait intéressant d'évaluer l'effet des PBDE, après incubation avec des microsomes hépatiques ovins, sur la liaison de la T3 aux protéines de transport. Une alternative a été de déterminer l'effet *in vivo*.

Etudes *in vivo*

Un essai de dialyse à l'équilibre a été réalisé sur du plasma déthyroïdé de quatre brebis avant et après 28 jours de traitement aux PBDE (deux brebis traitées au penta-BDE et deux brebis traitées au déca-BDE). Les paramètres de liaison de la T3 aux protéines de transport n'ont pas été modifiés par le traitement PBDE. Notre hypothèse est que la déthyroïdation avec le charbon actif a entraîné l'élimination des PBDE ou de leurs métabolites et donc a empêché toute possibilité d'action des PBDE sur les paramètres de liaison.

Le pourcentage de T3 libre, déterminé par dialyse à l'équilibre pour chaque brebis n'a pas été modifié par 28 jours de traitement aux PBDE. A noter toutefois que le pourcentage de T3 libre obtenu par dialyse à l'équilibre est deux fois supérieur à celui observé par les dosages radioimmunologiques de la T3 libre avec respectivement pour le groupe témoin, déca-BDE et penta-BDE, $0,22 \pm 0,011$; $0,21 \pm 0,015$ et $0,21 \pm 0,011$ % de T3 libre pour le dosage radioimmunologique et $0,38 \pm 0,039$; $0,38 \pm 0,028$ et $0,41 \pm 0,047$ % pour la dialyse à l'équilibre. Le pourcentage de T3 libre rapporté dans la littérature est de 0,2% chez le mouton (Yokus, 2006, méthode d'électro-chimiluminescence-immunologique). La dialyse à l'équilibre est considérée comme la méthode de référence d'autant plus que le dosage radioimmunologique de la T3 libre n'a pas été validé chez le mouton. Toutefois, la dialyse à l'équilibre se heurte à une difficulté méthodologique liée à la faible importance de la fraction libre de la T3. Le dialysat est inévitablement contaminé par une quantité de radioactivité portée par les résidus d'iode radioactif. Il est possible que la méthode de précipitation de la T3 radiomarquée des dialysats avec des sels de magnésium ne permette pas de séparer totalement les atomes d'iode radiomarqués, surestimant ainsi la fraction libre de T3.

Les paramètres de liaison aux protéines plasmatiques, déterminés chez les brebis thyroïdectomisées et traitées pendant 39 à 46 jours aux PBDE, n'ont pas été modifiés par le traitement. La capacité maximale de liaison de la T3 à la TBG dans le groupe témoin est de 120 ± 32 ng/mL. Elle est du même ordre de grandeur que celle précédemment décrite pour la T4 chez les ovins par Sutherland en 1975 ($B_{max} = 128$ ng/mL). La constante de dissociation à l'équilibre du complexe TBG-T3 dans le groupe témoin est de $0,556 \pm 0,191$ ng/mL. Elle est supérieure à celle décrite par Sutherland chez les ovins pour la T4 ($K_d = 0,0855$ ng/mL), ce qui est cohérent avec l'affinité inférieure de la TBG pour la T3 en comparaison avec son affinité pour la T4.

En définitive, nos études *in vivo* ne montrent pas d'altération par les PBDE de la liaison de la T3 à la TBG à ces doses d'exposition. D'autres études *in vivo* ont montré une diminution de la constante d'affinité entre T4 et les protéines plasmatiques provoquée par les PBDE. Chez la rate exposée par voie orale pendant 14 jours à 18 mg/kg/j de tétra-BDE, une altération de la liaison de T4 à la transthyréline est obtenue (Hallgren, 2002) et il a été démontré que l'exposition aux PBDE chez l'homme (concentration de PBDE dans le sérum : 69,9 ng/g de lipides) est associée à une diminution du pourcentage de liaison entre la TBG et T4 (Turyk, 2008). Cependant, la comparaison avec nos résultats est difficile à réaliser car nous n'avons pas étudié la liaison de la T4, notre modèle ne dissocie pas la liaison à la transthyréline de celle à l'albumine et à l'heure actuelle, nous ne connaissons pas la concentration en PBDE dans le plasma des brebis.

Effet des PBDE sur la pharmacocinétique de T4

Pour étudier la pharmacocinétique de la T4, il était important de maintenir des concentrations de T3 physiologiques afin de ne pas modifier le métabolisme ni de T4 ni des PBDE. En effet, l'UDPGT, enzyme clé impliquée dans le métabolisme hépatique de T4, est régulée par T3 (Masmoudi, 1997) et constitue également une cible potentielle des PBDE. C'est pourquoi, les thyroïdectomies ont été suivies d'administrations SC quotidiennes de T3 à la dose de 3 $\mu\text{g/kg/j}$. Ce modèle a permis d'obtenir des concentrations plasmatiques physiologiques de T3 (moyennes \pm ET respectivement pour le groupe témoin, déca-BDE et penta-BDE de, $0,75 \pm 0,08$; $0,68 \pm 0,10$ et $0,80 \pm 0,11$ ng/mL), comparables à celles observées avant thyroïdectomie (avec respectivement pour les trois groupes, $0,92 \pm 0,11$; $0,84 \pm 0,05$ et $0,78 \pm 0,16$ ng/mL, ANOVA, $p=0,235$). Il est donc pertinent pour l'étude de la clairance de T4.

Pour confirmer la validité de notre modèle euthyroïdien vis-à-vis de T3 chez la brebis, les valeurs de la clairance de T4 (libre et totale) calculées dans notre étude ont été comparées à celles rapportées dans la bibliographie (Chopra, 1975, De Pablo-Davila, 1980 et Leghait, 2008). Elles sont du même ordre de grandeur (tableau XXI).

Tableau XXI : Comparaison des valeurs de la clairance de T4 (libre et totale) chez les ovins rapportées dans la littérature

Source	Clairance de la T4 totale (mL/min/kg)	Clairance de la T4 libre (mL/min/kg)	Modèle
De Pablo-Davila, 1980 (n = 5)	0,042 ± 0,007		Radio immuno marquage
Chopra, 1975 (n = 4)	0,040 ± 0,010		Radio immuno marquage
Leghait, 2008 (n = 5)	0,02 ± 0,01	178 ± 22	Thyroïdectomie + administration de T3
Notre étude J47 (groupe témoin, n = 4)	0,025 ± 0,005	199 ± 67	Thyroïdectomie + administration de T3

La clairance de T4 libre est très élevée par rapport à celle de T4 totale. En théorie, une clairance plasmatique ne peut être supérieure au débit cardiaque qui est en moyenne de 3,8 L/min chez la brebis (Hecker, 1983). La clairance de T4 libre pour le groupe de brebis témoin s'élève à 14,7 L/min, une valeur environ 4 fois supérieure au débit cardiaque, ce qui suggère que la T4 n'est pas uniquement éliminée du secteur plasmatique par les organes d'épuration classiques de l'organisme (foie, reins, poumons). En effet, elle serait largement distribuée dans les tissus et son élimination inclurait la désiodation de T4 en T3 au niveau des tissus cibles, c'est la raison pour laquelle, la clairance plasmatique est supérieure au débit cardiaque. Cela est cohérent avec le volume de distribution élevé (tableau XIII).

Les paramètres pharmacocinétiques de T4 totale suggèrent une distribution limitée au compartiment plasmatique (faibles valeurs de la clairance et du volume de distribution à l'équilibre) et donc appuient l'hypothèse du rôle protecteur des protéines plasmatiques de transport vis-à-vis des mécanismes de clairance. Les protéines plasmatiques de transport limitent ainsi la diffusion tissulaire y compris hépatique de la T4 totale.

Dans notre étude, le traitement au penta-BDE a entraîné une diminution du temps moyen de résidence et du temps de demi-vie de T4 libre. Or, le temps de demi-vie d'élimination plasmatique de la T4, temps mis pour diminuer de moitié la concentration plasmatique de T4,

est un paramètre hybride qui est le reflet à la fois de l'élimination de T4 mais également de sa distribution dans l'organisme selon l'équation suivante :

$$t_{1/2} = \ln 2 (V_{ss} / Cl) \quad \text{Equation 16}$$

Par conséquent, une diminution du temps de demi-vie pourrait résulter d'une diminution du volume de distribution à l'équilibre et/ou d'une augmentation de la clairance. Or dans notre étude, on observe une tendance non significative à une diminution du volume de distribution à l'équilibre de la T4 libre dans le groupe penta-BDE alors que la clairance plasmatique reste relativement comparable dans les trois groupes (tableau XIII). On peut supposer qu'avec un nombre plus élevé de brebis, on aurait pu observer un effet du penta-BDE sur le volume de distribution à l'équilibre.

Mécanisme d'action potentiel

Pour approfondir les effets des PBDE sur la pharmacocinétique de T4, il serait intéressant d'évaluer les enzymes hépatiques dont l'expression et/ou l'activité sont modifiées par les PBDE et leur implication dans le métabolisme des hormones thyroïdiennes. Ainsi, des études montrent que les PBDE pourraient augmenter la glucuronoconjugaison des hormones thyroïdiennes, ce qui est cohérent avec la diminution de 24% du temps de demi-vie et de 43% du temps moyen de résidence de T4 libre observée dans notre étude. Les PBDE pourraient agir sur le catabolisme hépatique de la T4. Ainsi, chez des rates gravides, un traitement avec le penta-BDE à des doses de 1, 10 ou 30 mg/kg/j du 6^{ème} jour de gestation jusqu'au 21^{ème} jour post-natal entraîne une augmentation de l'activité de l'UDPGT chez les mères et chez leurs portées, notamment à la dose de 30 mg/kg/j (Zhou, 2002).

Que suggèrent ces résultats en terme de risques pour la santé humaine lié à l'exposition aux PBDE ?

Depuis 2004, les PBDE faiblement bromés dont le penta-BDE ont été interdits en Europe (directive 2002/95/CE). De plus, par un arrêté du 1er avril 2008 pris par la Cour de justice des communautés européennes, le déca-BDE est soumis à des conditions restreintes d'utilisation (Talsness, 2008). Il reste cependant utilisé notamment dans les textiles et les plastiques.

Aux Etats-Unis, certains états ont interdit l'utilisation et la distribution du penta-BDE et de l'octa-BDE. Les états du Maine et de Washington ont également restreint l'utilisation du

déca-BDE depuis 2008. De plus, l'unique site de production de penta-BDE et d'octa-BDE des Etats-Unis (la Great Lakes Chemical Corporation) a arrêté sa production depuis 2004.

Pendant cette période intermédiaire (2004-2008), l'utilisation du déca-BDE est devenue majoritaire du fait de l'interdiction des autres PBDE. En 2007, il représentait environ 80% du marché mondial des PBDE (Van den Steen, 2007 ; BSEF, 2003).

Malgré son interdiction, le penta-BDE reste encore présent en raison de sa bioaccumulation, de sa stabilité et de la formation de dérivés moins bromés à partir du déca-BDE.

En effet, deux ans après leur interdiction, le niveau des PBDE allant des tri-BDE aux hexa-BDE dans la poussière des maisons est encore de 160 ng/g aux Pays-Bas et de 98 ng/g au Royaume-Uni (Harrad, 2008).

Le déca-BDE peut se débromer sous l'action des UV dans les sols (Olsman, 2006). De même, on peut obtenir la débromation du nona-BDE en tétra-BDE sur différentes matrices (sédiments, terre, sable) sous l'effet d'une lumière artificielle ou d'une lumière naturelle (Soderstrom, 2004).

Cette débromation peut également s'effectuer dans les organismes vivants. En effet, chez le rat, suite à l'administration par voie orale de 3 $\mu\text{mol/kg}$ de ^{14}C -déca-BDE, les métabolites mis en évidence dans les fèces, la bile, le foie, la paroi de l'intestin grêle, le rein, les poumons et le tissu adipeux sont des métabolites hydroxylés et/ou méthoxylés issus de processus d'oxydation du déca-BDE, ainsi que des métabolites issus de la débromation du déca-BDE (nona-BDE, octa-BDE, hepta-BDE et hexa-BDE) (Mörck, 2003).

Chez l'homme, un octa-BDE à une concentration sérique de 2 à 4 pmol/g de lipides a été retrouvé dans le sang de travailleurs exposés uniquement au déca-BDE après un jour d'exposition (Thuresson, 2006).

En définitive, l'exposition humaine aux PBDE est réelle quelque soit le degré de bromation, avec des concentrations en hexa-BDE comprises entre 0,064 et 9,6 ng/g de lipides avec une moyenne de $0,89 \pm 1,1$ ng/g dans le sérum de femmes enceintes (Antignac, 2009).

Mais, contrairement aux études toxicologiques précédentes menées sur les PBDE, nous avons utilisé, sur un modèle ovin, proche de l'homme au niveau de la fonction thyroïdienne, une dose (100 ng/kg/j) proche de l'exposition humaine (10 ng/kg/j chez le nourrisson ; Zalko, 2003). Avec ces faibles expositions, nous avons montré une absence d'effet perturbateur thyroïdien du déca-BDE alors que le penta-BDE est capable de modifier le métabolisme de la T4 libre.

Concernant le penta-BDE, chez la souris, la plus faible NOAEL déterminée dans la littérature est de 0,4 à 0,8 mg/kg (Viberg, 2004). En prenant un facteur de sécurité de 100, on peut considérer que la DJA est de l'ordre de 4 à 8 µg/kg, soit 400 à 800 fois supérieure à l'exposition quotidienne du nourrisson. Dans notre étude, nous avons observé des effets perturbateurs thyroïdiens du penta-BDE chez le mouton mais à une dose très inférieure à la DJA. Cette dose a été administrée par voie intraveineuse (soit une biodisponibilité de 100%) alors que la DJA correspond majoritairement à une exposition par voie orale ou par inhalation. Cependant, même si la biodisponibilité par voie orale du penta-BDE était très faible chez l'homme (par exemple 5 %), des effets perturbateurs pourraient être observés pour des doses de 2 µg/kg, soit du même ordre de grandeur que la DJA, suggérant qu'il conviendrait de réévaluer la DJA à la baisse.

Conclusion et perspectives

Notre étude, réalisée sur un modèle ovin proche de l'homme en ce qui concerne la régulation de la fonction thyroïdienne, montre que le penta-BDE (substance désormais interdite) à la dose de 100 ng/kg/j entraîne une diminution du temps de demi-vie et du temps moyen de résidence de la T4 libre chez la brebis. Ce composé présente donc un potentiel perturbateur thyroïdien, même à faible dose (100 ng/kg/j = 10 fois la dose à laquelle le nourrisson est exposé dans son environnement quotidien).

En revanche, aucun effet toxique du déca-BDE sur la fonction thyroïdienne n'a été mis en évidence, dans notre étude.

La modification des paramètres pharmacocinétiques de T4 libre suggère qu'ils pourraient constituer des marqueurs plus sensibles des effets perturbateurs thyroïdiens que les concentrations plasmatiques des hormones thyroïdiennes, bien qu'ils ne soient pas classiquement évalués dans les études toxicologiques. En revanche, les concentrations de T3 et de T4 seraient moins sensibles à l'effet perturbateur thyroïdien à court terme en raison de potentiels mécanismes, centraux et/ou périphériques, compensant leur variation d'élimination.

Pour extrapoler nos résultats à l'homme, il est nécessaire d'évaluer l'exposition aux PBDE des brebis afin de comparer les concentrations plasmatiques des brebis de notre modèle avec celles observées chez l'homme.

Pour mieux comprendre le mécanisme d'action des PBDE, il serait intéressant d'approfondir leur effet sur les activités enzymatiques hépatiques impliquées dans le métabolisme des hormones thyroïdiennes chez les ovins.

Permis d'imprimer

Références bibliographiques

AGRELL, C., TER SCHURE, A. F., SVEDER, J. *et al.*

Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) at a solid waste incineration plant I : atmospheric concentrations.

Atmospheric Environment, 2004, **38**, 5139–5148.

ANAI, H.

Activation of hypothalamic neuronal nitric oxide synthase in lithium-induced diabetes insipidus rats.

Psychoneuroendocrinology, 2001, **26** (2), 109-120.

ANTIGNAC, J.P., CARIOU, R., ZALCO, D. *et al.*

Exposure assessment of french women and their newborn to brominated flame retardants : determination of tri- to deca-polybromodiphenylethers (PBDE) in maternal adipose tissue, serum, breast milk and cord serum.

Environmental Pollution, 2009, **157**, 164 –173.

BLOOM, M., SPLIETHOFF, H., VENA, J. *et al.*

Environmental exposure to PBDEs and thyroid function among New York anglers.

Environmental Toxicology and Pharmacology, 2008, **25**, 386-392 .

BSEF : Bromine Science Environmental Forum. (Page consultée le 15/01/08). Site du BSEF, [en ligne]. Adresse URL : www.bsef.com/.

CHOPRA, I.J., SACK, J., FISHER, D.A.

3,3',5'-Triiodothyronine (reverse T3) and 3,3',5'-triiodothyronine (T3) in fetal and adult sheep : studies of metabolic clearance rates, production rates, serum binding, and thyroïdal content relative to thyroxine.

Endocrinology, 1975, **97** (5), 1080-1088.

CHOPRA, I.J.

An assessment of daily production and significance of thyroïdal secretion of 3,3',5'-triiodothyronine (reverse T3) in man.

Journal of Clinical Investigation, 1976, **58**, 32-40.

COVACI, A., DE BOER, J., RYAN, J.J., *et al.*

Distribution of organobrominated and organochlorinated contaminants in Belgian human adipose tissue.

Environmental Research, 2002, Section A, **88**, 210-218.

COVACI, A., GHEORGHE, A., VOORSPOELS, S., *et al.*

Polybrominated diphenyl ethers, polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in sediment cores from the Western Scheldt river (Belgium): analytical aspects and depth profiles.

Environment International, 2005, **31**, 367-375.

CURRAN, P., DEGROOT, L.

The effect of hepatic enzyme-inducing drugs on thyroid hormones and the thyroid gland.

Endocrine reviews, 1991, **12** (2), 135-148.

- DAHL, E, EVANS, N.P., THRUN, L.A., *et al.*
A central negative feedback action of thyroid hormones on thyrotropin-releasing hormone secretion.
Endocrinology, 1994, **135** (6), 2392-2397.
- DARNERUD, P.O., ERIKSEN, G.S., JOHANNESSON, T. *et al.*
Polybrominated diphenyl ethers : occurrence, dietary exposure and toxicology.
Environmental Health Perspectives, 2001, **109**, 49-68.
- DEGROOT, L.J.
Transport, cellular uptake and metabolism of thyroid hormone. In : *Endocrinology USA* : W.B. Saunders Company, 1989, 2nd edition, Vol.1, 544.
- DE PABLO-DAVILA, F.
Study of the kinetics of the thyroid hormones and the peripheral conversion rate of thyroxine to triiodothyronine in acute renal insufficiency under experimental conditions.
Hormone and Metabolic Research, 1980, **12** (10), 529-36.
- Directive 2002/95/CE du parlement européen et du conseil du 27 janvier 2003 relative à la limitation de l'utilisation de certaines substances dangereuses dans les équipements électriques et électroniques.
Journal officiel de l'Union Européenne, 2003, L 37, 19 : 23.
- ERIKSSON, P., JAKOBSSON, E., FREDRIKSSON, A.
Developmental neurotoxicity of brominated flame-retardants, polybrominated diphenyl ethers and tetra-bromo-bisphenol A.
Organohalogen compounds, 1998, **35**, 375-377.
- FERNIE, K.J., SHUTT, J.L., MAYNE, G., *et al.*
Exposure to polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) : changes in thyroid, vitamin A, glutathione homeostasis, and oxidative stress in American kestrels (*Falco sparverius*).
Toxicological Sciences, 2005, **88**, 375-383.
- FOWLES, J. R., FAIRBROTHER, A., BAECHEER-STEPPAN, *et al.*
Immunologic and endocrine effects of the flame-retardant pentabromodiphenyl ether (DE-71) in C57BL/6J mice.
Toxicology, 1994, **86**, 49-61.
- GILL, U., CHU, I., RYAN, J.J., *et al.*
Polybrominated diphenyl ethers : human tissue levels and toxicology.
Environmental Contamination and Toxicology, 2004, **183**, 55-97.
- HAKK, H., LARSEN, G., KLASSON-WEHLER, E.
Tissue disposition, excretion and metabolism of 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether (BDE-99) in the male Sprague-Dawley rat.
Xenobiotica, 2002, **32**, 369-382.

HALLGREN, S., DARNERUD, P.

Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and chlorinated paraffins (CPs) in rats - testing interactions and mechanisms for thyroid hormone effects.
Toxicology, 2002, **177**, 227–243.

HARRAD, S., IBARRA, C., DIAMOND, M., *et al.*

Polybrominated diphenyl ethers in domestic indoor dust from Canada, New Zealand, United Kingdom and United States.
Environment International, 2008, **34**, 232-238.

HECKER, J.F.

The sheep as an experimental animal.
Academic press Inc. Londres ed. 1983. 216 p.

JANNINI, E.A., ULISSE, S., D'ARMIENTO, M.

Thyroid hormone and male gonadal function.
Endocrine Reviews, 1995, **16** (4), 443-59.

KARTER, MJ.

Fire loss in the United States during 2005. Quincy, MA : National Fire Protection Association., 2006, 39 p.

KRASSAS, G.E.

Thyroid disease and female reproduction.
Fertility and Sterility, 2000, **74** (6), 1063-1070.

KUIPER, R.V., VETHAAK, A.D., CANTON, R.F., *et al.*

Toxicity of analytically cleaned pentabromodiphenylether after prolonged exposure in estuarine European flounder (*Platichthys flesus*), and partial life-cycle exposure in fresh water zebra fish (*Danio rerio*).
Chemosphere, 2008, **73**, 195–202.

KURIYAMA, S. N., WANNER, A., FIDALGO-NETO, A. A. *et al.*

Developmental exposure to low-dose PBDE-99 : Tissue distribution and thyroid hormone levels.
Toxicology, 2007, **242**, 80–90.

LARSEN, D.T., SCHLUMBERGER, M.J., HAY, I.D.

Thyroid physiology and diagnostic evaluation of patients with thyroid disorders.
Williams Textbook of Endocrinology, 2002, 331-365.

LEGHAIT, J.

Evaluation du potentiel perturbateur thyroïdien du fipronil chez deux espèces : le rat et le mouton.
Th. : Pathologie, toxicologie, génétique et nutrition : Toulouse, Université Toulouse III – Paul Sabatier : 2008. 125 pp.

LEGHAIT, J., GAYRARD, V., PICARD-HAGEN, N. *et al.*

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

MASMOUDI, T., HIHI, A.K., VAZQUEZ, M. *et al.*

Transcriptional regulation by triiodothyronine of the UDP-glucuronosyltransferase family 1 gene complex in rat liver.

Journal of Biological Chemistry, 1997, **272** (27), 17171-5.

MEERTS, I. A. T. M., VAN ZANDEN, J. J., LUIJKS, E. A. C., *et al.*

Potent competitive interactions of some brominated flame retardants and related compounds with human transthyretin *in vitro*.

Toxicological Sciences, 2000, **56**, 95-104.

MORCK, A., HAKK, H., ÖRN, U., *et al.*

Decabromodiphenyl ether in the rat : absorption, distribution, metabolism, and excretion.

Drug metabolism and disposition, 2003, **31**, 900-907.

NORRIS, J. M., KOCIBA, R. J., SCHWETZ, B. A., *et al.*

Toxicology of octabromobiphenyl and decabromodiphenyloxyde.

Environmental Health Perspectives, 1975, **11**, 153-61.

NTP (National Toxicology Program).

Toxicology and carcinogenesis studies of decabromodiphenyl oxide (CAS NO. 1163-19-5) in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed studies).

U.S. department of health and human services, 1986, Technical Report Series No. 309, NIH Publication No. 86-2565.

OLSMAN, H., HAGBERG, J., KALBIN, G., *et al.*

Ah receptor agonists in UV-exposed toluene solutions of decabromodiphenyl ether (decaBDE) and in soils contaminated with polybrominated diphenyl ethers (PBDEs).

Environ Science and Pollution Research International, 2006, **13** (3), 161-169.

SODERSTROM, G., SELLSTROM, U., DE WIT, C. A., *et al.*

Photolytic debromination of decabromodiphenyl ether (BDE 209).

Environmental Science and Technology, 2004, **38**, 127-32.

STERLING, K., BRENNER, M.A.

Free thyroxine in human serum : simplified measurement with the aid of magnesium precipitation.

Journal of Clinical Investigation, 1966, **45**, 153-156.

STOKER, T. E., LAWS, S. C., CROFTON, K. M., *et al.*

Assessment of DE-71, a commercial polybrominated diphenyl ether (PBDE) mixture, in the EDSP male and female pubertal protocols.

Toxicological Sciences, 2004, **78**, 144-155.

SUTHERLAND, R.L., SIMPSON-MORGAN, M.W.

The thyroxine-binding properties of serum proteins. A competitive binding technique employing sephadex G-25.

Journal of Endocrinology, 1975, **65**, 319-332.

TALSNESS, C.,E., KURIYAMA, S.N., STERNER-HOCK, A. *et al.*

In utero and lactational exposures to low doses of polybrominated diphenyl ether-47 alter the reproductive system and thyroid gland of female rat offspring.
Environmental Health Perspectives, 2008, **116** (3), 308-314.

TER SCHURE, A. F., LARSSON, P., AGRELL, C., *et al.*

Atmospheric transport of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls to the Baltic Sea.

Environmental Science and Technology, 2004, **38**, 1282-7.

THOMSEN, C., LIANE, V.H., BECHER, G.

Automated solid-phase extraction for the determination of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls in serum application on archived Norwegian samples from 1977 to 2003.

Journal of Chromatography, 2007, **B 846**, 252–263.

THURESSON, K., HOGLUND, P., HAGMAR, L., *et al.*

Apparent half-lives of hepta- to decabrominated diphenyl ethers in human serum as determined in occupationally exposed workers.

Environmental Health Perspectives, 2006, **114**, 176-81.

TOMY, G.T., PALACE, V.P., HALLDORSON, T., *et al.*

Bioaccumulation, biotransformation, and biochemical effects of brominated diphenyl ethers in juvenile lake trout (*Salvelinus namaycush*).

Environmental Science and Technology, 2004, **38**, 1496–1504.

TURYK, M.E., PERSKY, V.W., IMM, P., *et al.*

Hormone disruption by PBDEs in adult male sport fish consumers.

Environmental Health Perspectives, 2008, **116** (12), 1635-1641.

TSENG, L., LI, M.H., TSAI, S.S., *et al.*

Developmental exposure to decabromodiphenyl ether (PBDE 209) : effects on thyroid hormone and hepatic enzyme activity in male mouse offspring.

Chemospher, 2007, **70**, 640-648.

VAN DEN STEEN, E., COVACI, Z., WATANABE, I. *et al.*

Accumulation, tissue-specific distribution and debromination of decabromodiphenyl ether (BDE 209) in European starlings (*Sturnus vulgaris*).

Environmental Pollution, 2007, **148**, 648-653.

VIBERG, H., FREDRIKSSON, A., ERIKSSON, P.

Investigations of strain and/or gender differences in developmental neurotoxic effects of polybrominated diphenyl ethers in mice.

Toxicological sciences, 2004, **81**, 344–353.

WILFORD, B. H., SHOEIB, M., HARNER, T. *et al.*

Polybrominated diphenyl ethers in indoor dust in Ottawa, Canada : implications for sources and exposure.

Environmental Science and Technology, 2005, **39**, 7027-35.

YAMADA, H., DISTEFANO, J.J., YEN, Y. *et al.*

Steady-state regulation of whole-body thyroid hormone pool sizes and interconversion rates in hypothyroid and moderately T3-stimulated rats.

Endocrinology, 1996, **137**, 5424-5633.

YASUO, S., NAKAO, N., OHKURA, S., *et al.*

Long-day suppressed expression of type 2 deiodinase gene in the mediobasal hypothalamus of the Saanen goat, a short-day breeder : implication for seasonal window of thyroid hormone action on reproductive neuroendocrine axis.

Endocrinology, 2006, **147** (1), 432-440.

YOKUS, B., CAKIR, U.D.

Seasonal and physiological variations in serum chemistry and mineral concentrations in cattle.

Biological Trace Element Research, 2006, **109** (3), 255-66.

YUAN, J, CHEN, L, CHEN, D., *et al.*

Elevated serum polybrominated diphenyl ethers and thyroid-stimulating hormone associated with lymphocytic micronuclei in Chinese workers from an E-waste-dismantling site.

Environmental Science and Technology, 2008, **42**, 2195–2200.

ZALKO, D., SOTO, A. M., DOLO, L., *et al.*

Biotransformations of bisphenol A in a mammalian model : answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant CD1 mice.

Environmental Health Perspectives, 2003, **111**, 309-19.

ZHOU, T., TAYLOR, M. M., DEVITO, M. J., *et al.*

Developmental exposure to brominated diphenyl ethers results in thyroid hormone disruption.

Toxicological Sciences, 2002, **66**, 105-16.

Toulouse, 2009

NOM : RAUZET

PRENOM : Nathalie

TITRE : EVALUATION DE L'ALTERATION DE LA FONCTION THYROIDIENNE PAR LES POLYBROMODIPHENYLE ETHERS CHEZ LE MOUTON

RESUME :

Les polybromodiphényle éthers (PBDE) sont des retardateurs de flamme couramment utilisés dans beaucoup d'industries. Ce sont des perturbateurs thyroïdiens chez les rongeurs. Le but de ce travail était d'évaluer leur potentiel perturbateur thyroïdien chez le mouton, une espèce plus proche de l'homme en terme de régulation thyroïdienne.

Le traitement penta-BDE et déca-BDE (le seul encore autorisé dans l'UE) à une faible dose, proche de la contamination humaine (100 ng/kg/j pendant 28 jours) n'a eu d'effet ni sur les concentrations plasmatiques moyennes des hormones thyroïdiennes et de la TSH ni sur les paramètres pharmacocinétiques de T4 totale ni sur la liaison de T3 aux protéines plasmatiques.

En revanche, le penta-BDE a diminué le temps de demi-vie et le temps moyen de résidence de T4 libre montrant son effet perturbateur thyroïdien chez le mouton alors que c'est n'est pas le cas du déca-BDE dans les mêmes conditions.

MOTS CLES : THYROIDE - POLYBROMODIPHENYLE ETHER – MOUTON – RETARDATEUR DE FLAMME – PERTURBATEUR THYROIDIEN

ENGLISH TITLE : EVALUATION OF THYROID DISRUPTION BY POLYBROMODIPHENYL ETHERS ON SHEEP

ABSTRACT :

Polybromodiphenyl ethers (PBDE) are flame retardants commonly used in several industries. They are thyroid disruptors in rodents. The aim of this study was to evaluate their thyroid disrupting effect in sheeps, a specie more relevant to humans as far as thyroid regulation is concerned.

Penta-BDE and deca-BDE (the only PBDE still authorized in the EU) treatments at low dose within the range of human contamination (100 ng/kg/d in 28 days) affected neither mean thyroid hormones and TSH plasma concentration nor total T4 pharmacokinetic parameters nor T3 binding to plasmatic proteins.

In contrast, penta-BDE treatment decreased free T4 half-life and mean residence time highlighting the potential of this compound as a thyroid disruptor in sheep while deca-BDE in the same conditions did not.

KEY WORDS : THYROID - POLYBROMODIPHENYL ETHER – SHEEP – FLAME RETARDANT – THYROID DISRUPTOR