

Le fipronil, agent de perturbation thyroïdienne ? Exposition et réévaluation de sa toxicité thyroïdienne dans l'espèce ovine, modèle pour la régulation thyroïdienne de l'Homme

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

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

par
Elodie, Laure, Solène PELISSIE
Née le 10 décembre 1985 à Toulouse (Haute Garonne)

Directeur de thèse : Mme le Docteur Véronique GAYRARD-TROY

JURY

PRESIDENT :

M. Philippe CARON

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :

Mme Véronique GAYRARD-TROY
Mme Nicole HAGEN-PICARD

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

MEMBRE INVITE :

Mme Catherine VIGUIE

Docteur vétérinaire

Avant-propos

Ces travaux de thèse ont fait l'objet, à l'heure actuelle, de la communication suivante :

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

Evaluation of fipronil-induced thyroid disruption in a TBG-expressing species.

ENDO2008 The Endocrine Society's 90th annual meeting (2008), San Francisco, USA.

Remerciements

Aux membres du jury de thèse,

A Monsieur le Professeur Philippe CARON,

De l'Université Paul Sabatier,

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse,

Hommages respectueux.

A Madame de Docteur Véronique GAYRARD-TROY,

De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Pour m'avoir confié cette étude, et pour sa relecture et ses conseils.

Sincère reconnaissance.

A Madame le Professeur Nicole HAGEN-PICARD,

De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Sincères remerciements.

A Madame le docteur Catherine VIGUIE,

Docteur Vétérinaire.

Pour son aide et ses conseils tout au long de ce travail.

Sincère reconnaissance.

Aux membres du laboratoire de physiologie,

A Messieurs les Professeurs Pierre-Louis TOUTAIN et Alain BOUSQUET-MELOU,

Pour m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire.

Sincères remerciements.

A l'équipe du Laboratoire de Physiologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Pour votre aide précieuse lors des phases expérimentales.

A Julien LEGHAIT,

Pour ton soutien et ta bonne humeur, ce fut un plaisir de travailler avec toi.

Dédicaces

A ma famille,

Mes parents, toujours débordants d'énergie et d'amour.

Ma grande grande soeur Marion et ma sister Fanny,
Merci d'avoir toujours été là, et qu'on reste toujours aussi proches !!

Mes nièces, mes rayons de soleil sur patte !

Mamie, pour avoir toujours cru en moi.

Jean et Jo, pour votre soutien au cours des longues années de prépa ... à quand les prochaines profiteroles ?

Coco, pour m'avoir toujours donné un refuge parisien, du concours à la dernière année d'école. Ton courage et ta volonté sont un vrai exemple à suivre.

Monique et Dominique, pour votre aide tout au long des années d'études.

Gil et Nic, après un bonbon bleu et beaucoup de voyages ...

Marie-Hélène et Fred, pour le courage dont vous faites preuve, et le positif que vous distribuez autour de vous !

Mes cousins et cousines, trop nombreux pour les nommer, mais que je n'oublie pas.

Lydie, merci de m'avoir tant aidée ...

A mes amis,

Julie, ma Pookie, toujours présente. Je suis mieux que moi quand tu es là.

Cédric, merci pour tant de schtroumf !

A ceux de l'ENVT,

Marie-Hélène, de Toulouse à Paris, via l'Andalousie, la Corse et le Mali ...

Marie, vivent les chaussures à talon et les soirées arrosées !

Virginie, pour tous nos délires.

Gwen, merci de t'être si bien occupée de ta p'tite poulette !

Audrey et Cyril, pour avoir bien suivi mes cours d'agence matrimoniale ...

Hélène, Kévin, les Morgane, Sophie, Cyrielle, Benoît, et mes poulots, merci pour tous ces bons moments !

A ceux de l'ENVA, Anna, Carole, Marie, Caroline, Virginie, Hélène, et tous les autres, pour avoir si bien accueilli une toulousaine !

Aux amis aveyronnais (personne n'est parfait...) : Plantine, Lio, Kiki et Flo, Ade, Laure, Steph, MP, Benoît, Ophélie. Ca dure depuis la maternelle ... et pour longtemps encore j'espère !

Aux lotois et assimilés,

Arnaud, pour ta présence et ton soutien dès la prépa,

Hélène "3 p'tits chats", pour ta bonne humeur,

Nathalie, David, Frédéric, Hélène, Camille, merci !

A mes co-internes, Clotilde, Hélène, Marie, pour toutes ces heures passées et à venir à travailler mais surtout à rire ensemble !

Table des matières

Liste des illustrations	12
Liste des abréviations	13
Introduction.....	15
CHAPITRE I - Etude bibliographique	17
1. Le fipronil.....	17
1.1. Aspects moléculaires.....	17
1.2. Toxicocinétique.....	18
1.2.1. Absorption	18
1.2.2. Métabolisme.....	18
1.2.3. Distribution	20
1.2.4. Elimination	20
1.3. Effets délétères du fipronil chez les mammifères ?.....	20
1.3.1. Mécanisme d'action du fipronil	20
1.3.2. Neurotoxicité chez les mammifères	21
1.3.2.1. Signes cliniques suite à l'exposition au fipronil.....	21
1.3.2.2. Mécanismes : Interaction entre le fipronil et le système GABA des mammifères.....	23
1.3.2.3. Neurotoxicité des métabolites du fipronil chez les mammifères.....	23
1.3.3. Fipronil et métabolisme hépatique	24
2. Perturbation thyroïdienne et xénobiotiques.....	26
2.1. Différents mécanismes possibles de la perturbation thyroïdienne	26
2.1.1. Effets directs sur la thyroïde.....	26
2.1.2. Interaction avec les protéines de transport	27
2.1.2.1. Les protéines de transport.....	27
2.1.2.2. Perturbateurs endocriniens et protéines de transport	29
2.1.3. Effet sur les récepteurs aux hormones thyroïdiennes.....	29
2.1.4. Effet sur le métabolisme des hormones thyroïdiennes.....	29
2.1.4.1. Les désiodases	29
2.1.4.2. Le catabolisme hépatique [11].....	31
2.1.4.3. Le cycle entéro-hépatique.....	32
2.2. Cas particulier du fipronil : schéma physiopathologique proposé chez le rat.....	33
2.2.1. Fipronil et métabolisme hépatique des hormones thyroïdiennes chez le rat..	33
2.2.2. Fipronil, concentration en TSH et action au niveau de la thyroïde.....	34
2.3. Remise en question du modèle rongeur : TBG et protection	34
2.3.1. Structure et fonction de la TBG	34
2.3.1.1. Structure.....	34
2.3.1.2. Rôles	36
2.3.1.3. Régulation.....	37
2.3.2. Différences interspécifiques d'expression de la TBG	38
2.4. Effet du fipronil sur un modèle ovin : premières études	39
3. Objectifs de travail	40

CHAPITRE II. Partie expérimentale	41
1. Matériels et méthodes communs aux deux expériences	41
1.1. Animaux et prélèvements sanguins.....	41
1.2. Produits chimiques et préparations des solutions.....	41
1.3. Dosages	42
1.3.1. Dosages hormonaux	42
1.3.2. Dosages de fipronil et de fipronil sulfone	42
1.4. Analyses pharmacocinétiques	43
1.4.1. Analyses pharmacocinétiques de la thyroxine	43
1.4.2. Analyses pharmacocinétiques du fipronil	44
1.5. Analyses statistiques	45
2. Expérience 1 : Effet du fipronil sur les profils thyroïdiens de béliers à thyroïde intacte	46
2.1. Plan expérimental.....	46
2.1.1. Animaux et administration du fipronil.....	46
2.1.1.1. Détermination de la dose de fipronil à administrer.....	46
2.1.1.2. Modalités d'administration du fipronil.....	47
2.1.2. Prélèvements sanguins pour les profils endocriniens.....	47
2.1.3. Prélèvements sanguins pour les dosages de fipronil et fipronil sulfone	47
2.2. Résultats	49
2.2.1. Expositions au fipronil et au fipronil sulfone.....	49
2.2.2. Profils endocriniens.....	50
2.3. Discussion	52
2.3.1. Exposition au fipronil et au fipronil sulfone	52
2.3.2. Effet de l'administration de fipronil sur les profils thyroïdiens.....	52
3. Expérience 2 : Effet du fipronil sur la clairance des hormones thyroïdiennes dans un modèle euthyroïdien.....	54
3.1. Matériel et méthodes	55
3.1.1. Modèle animal.....	55
3.1.2. Préparation des solutions.....	55
3.1.2.1. Solution de T ₃	55
3.1.2.2. Solution de T ₄	56
3.1.3. Plan expérimental.....	56
3.1.3.1. Animaux et administration du fipronil	56
3.1.3.2. Prélèvements sanguins et pharmacocinétique des hormones thyroïdiennes.....	56
3.1.3.3. Prélèvements sanguins et dosage de fipronil	57
3.2. Résultats	58
3.2.1. Expositions au fipronil et au fipronil sulfone.....	58
3.2.2. Evolution des concentrations plasmatiques en T ₃	59
3.2.3. Clairance de la T ₄	60

CHAPITRE III. Discussion globale.....	62
1. Effet période significatif : quel mécanisme ?.....	62
2. Le fipronil affecte la clairance de la thyroxine, sans modifier la thyroxinémie : quel mécanisme ?.....	63
2.1. Hypothèse d'un mécanisme compensateur.....	63
2.1.1. Lié à l'expression de la TBG	63
2.1.2. Lié à une augmentation de synthèse.....	63
2.2. Absence d'induction enzymatique chez le mouton ?.....	63
2.3. Absence d'induction enzymatique aux doses utilisées dans l'expérience?.....	64
3. Influence du statut physiologique sur le métabolisme du toxique	65
3.1. Influence du sexe.....	66
3.2. Influence du statut thyroïdien.....	66
Conclusion	68
Bibliographie.....	69

Liste des illustrations

Liste des figures :

Figure 1 : Structure moléculaire du fipronil.....	17
Figure 2 : Schéma métabolique du fipronil chez le rat	19
Figure 3 : Structures et relations entre les principales iodothyronine activées ou désactivées par les désiodases	31
Figure 4 : Schéma de l'équilibre de conformation "en flip-flop" de la TBG	35
Figure 5 : Modèle compartimental de la cinétique de la T ₄ , par voie IV, chez le mouton.....	43
Figure 6 : Modèle compartimental de la cinétique du fipronil, PO, chez le mouton	45
Figure 7 : Plan expérimental de l'expérience 1 (béliers THI).....	48
Figure 8 : Concentrations plasmatiques moyennes ± ET de fipronil et de fipronil sulfone	49
Figure 9 : Modélisation de l'exposition au fipronil chez un bélier.....	49
Figure 10 : Effet du traitement au fipronil sur les concentrations plasmatiques moyennes (±ET) sur 24 h de TT ₃ , TT ₄ et fT ₄ chez des béliers	51
Figure 11 : Plan expérimental de l'expérience 2 (modèle THX+T ₃)	57
Figure 12 : Concentrations plasmatiques moyennes en fipronil et fipronil sulfone ± ET	58
Figure 13 : Modélisation de l'exposition au fipronil une brebis THX+T ₃	58
Figure 14 : Concentrations plasmatiques moyennes ±ET en TT ₄ et en fT ₄	60

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des affinités relatives du fipronil et du fipronil sulfone sur les récepteurs GABA des mammifères et des invertébrés, et sur les récepteurs glutamate des invertébrés.	24
Tableau 2 : Quelques propriétés et paramètres des principales protéines de transport des hormones thyroïdiennes dans le plasma chez l'Homme	28
Tableau 3 : Concentration plasmatique en TT ₄ chez différentes espèces, en fonction de la capacité de liaison de la TBG envers la thyroxine	36
Tableau 4 : Profils thyroïdiens chez l'Homme, les ovins et le rat	37
Tableau 5 : Caractéristiques des protéines de transport chez trois espèces	38
Tableau 6 : Paramètres PK moyens de fipronil chez les béliers et les brebis THX+T ₃	59
Tableau 7 : Paramètres PK de la TT ₄ et de la fT ₄ chez les brebis THX+T ₃ , avant et un mois après l'administration de fipronil (5mg/kg tous les 4 jours, PO) ou de solution témoin.....	61

Liste des abréviations

AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

ARNm : ARN messenger

AUC : aire sous la courbe

AUMC : aire sous la courbe du premier moment statistique

CAR : constitutive androstane receptor

Cl : clairance

C_{max} : concentration maximale

CYP : cytochrome P450

DIT : diiodotyrosine

DJA : dose journalière admissible

DL₅₀ : dose létale 50

DSE : dose sans effet

[³H]EBOB : 4'-ethynyl-4-*n*-[2,3-³H₂]propylbicycloorthobenzoate

HPLC : high performance liquid chromatography

ET : écart type

FAO : Food and Agriculture Organization

fT₃ : triiodothyronine libre

fT₄ : thyroxine libre

GABA : acide γ -amino-butyrique

GH : hormone de croissance

HPLC/MS : high performance liquid chromatography/mass spectrometry

IC₅₀ : inhibition concentration 50%

IV : voie intraveineuse

LOQ : limite inférieure de quantification

MIT : monoiodotyrosine

MRT : temps moyen de résidence

NIS : sodium iodide symporter

PCB : polychlorobiphényles

PK : pharmacocinétique

PO : *per os*

PCB : polychlorobiphényles
PTU : 6-n-propyl-2-thio-uracil
QC : contrôle qualité
RIA : radioimmunologic assay
SC : sous cutané
 $t_{1/2}$: temps de demi-vie
 T_3 : triiodothyronine
 T_4 : thyroxine
TBG : thyroxine-binding globulin
TCDD : 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine
THI : à thyroïde intacte
THX : thyroïdectomisé
THX+T3 : thyroïdectomisé et traité à la T3
 T_{max} : temps d'occurrence de la concentration maximale
TPO : thyroperoxydase
TRE : thyroid response element
TRH : thyrotropin releasing hormone
TSH : thyroid-stimulating hormone
 TT_3 : triiodothyronine totale
 TT_4 : thyroxine totale
TTR : transthyréline
UDPGT : uridine diphospho-glucuronosyltransférase
UV : ultraviolet
 V_{ss} : volume de distribution à l'état d'équilibre
WHO : World Health Organization

Introduction

L'incidence des tumeurs thyroïdiennes a significativement augmenté depuis quelques années. Aux Etats-Unis par exemple, 2 à 4 fois plus de ces tumeurs ont été diagnostiquées en 2002 par rapport à 1973 [16]. En France, l'augmentation est continue, avec une évolution du taux d'incidence standardisé de l'ordre de 6 % par an entre 1980 et 2005 [16]. Cette observation peut être due à l'amélioration des techniques médicales de diagnostic, ou bien à une réelle évolution due à l'action de différents facteurs, environnementaux notamment [76, 79].

Différents perturbateurs endocriniens sont susceptibles d'affecter la fonction thyroïdienne. D'après le Comité européen de stratégie sur les perturbateurs endocriniens, un perturbateur endocrinien est "une substance ou un mélange exogène qui altère une/des fonction(s) du système endocrinien, à l'origine par conséquent d'effets néfastes sur la santé d'un organisme intact, sur sa progéniture, ou sur une/des (sous) population(s)" [20]. Un tel produit peut interférer avec la synthèse, la sécrétion, le transport, l'action ou l'élimination d'une hormone dans un organisme. Si la plupart des études portent sur des substances affectant la fonction de reproduction, très peu d'études s'intéressent aux perturbations de la fonction thyroïdienne, ce qui est d'autant plus regrettable que ces altérations peuvent avoir des conséquences multiples et graves. Les hormones thyroïdiennes jouent en effet un rôle capital dans le maintien de l'homéostasie. Une altération du statut thyroïdien peut ainsi affecter le métabolisme basal de l'organisme, le métabolisme des lipides, mais aussi le système cardiovasculaire, la sphère gastro-intestinale, et les muscles [34]. Les conséquences les plus alarmantes en matière de santé publique résident probablement dans les effets sur le développement du système nerveux central. Ainsi, les données épidémiologiques suggèrent que des altérations même subtiles de la fonction thyroïdienne pendant la grossesse peuvent avoir des répercussions sur le développement cognitif et sensoriel de l'enfant [66].

Plusieurs molécules peuvent altérer la fonction thyroïdienne chez l'Homme et l'animal. Certaines agissent sur les récepteurs des hormones thyroïdiennes [24], d'autres sur les concentrations plasmatiques de T₄ et de TSH [36, 57, 60]. Parmi elles se trouve le fipronil, un pesticide largement utilisé depuis 1993 pour le contrôle des cultures, et comme anti-parasitaire externe vétérinaire, d'ailleurs le plus vendu au monde. Une relation serait clairement établie, chez le rat, entre l'exposition au fipronil et l'apparition d'hyperplasie et/ou d'hypertrophie de la thyroïde, voire d'adénomes et carcinomes thyroïdiens [21, 37]. Ceci s'expliquerait plus par un déséquilibre de la fonction thyroïdienne que par un effet directement génotoxique.

On peut cependant s'interroger sur l'effet du fipronil sur la thyroïde chez l'Homme. L'extrapolation d'une espèce à une autre est en effet toujours difficile, d'autant plus que la physiologie des hormones thyroïdiennes diffère entre l'Homme et le rat. Ainsi le temps de demi-vie de la T₄ est-il bien plus élevé chez l'Homme, de quelques jours, contre quelques heures pour le rat [19]. Cette différence s'explique principalement par l'expression continue de la thyroxine-binding globulin (TBG) dans l'espèce humaine, alors qu'elle est quasiment absente chez le rat adulte. La présence de cette protéine pourrait-elle protéger les hormones thyroïdiennes du processus de clairance, et ainsi limiter l'impact du fipronil, chez l'Homme, sur la fonction thyroïdienne ? Afin d'évaluer au mieux la toxicité thyroïdienne du fipronil chez l'Homme, il a été décidé d'étudier son impact sur les profils thyroïdiens chez une espèce exprimant elle aussi la TBG, telle que l'espèce ovine.

Cette thèse s'inscrit dans un programme de recherche mené par l'UMR 181 Physiopathologie et Toxicologie Expérimentales INRA/ENVIT, étudiant l'impact du fipronil sur la fonction thyroïdienne.

L'étude du fipronil et de ses interactions avec la physiologie thyroïdienne fait ressortir la nécessité d'étudier l'impact de ce pesticide sur les hormones thyroïdiennes dans un modèle animal physiologique, possédant un métabolisme thyroïdien proche de celui de l'Homme. Nous avons ainsi d'une part suivi les profils thyroïdiens de béliers à thyroïde intacte, et d'autre part étudié la clairance de la thyroxine chez des brebis euthyroïdiennes.

CHAPITRE I - Etude bibliographique

1. Le fipronil

Le fipronil, membre de la famille des phénylpyrazoles, est le principe actif de différents produits phytosanitaires, notamment le pesticide Régent TS[®], et d'antiparasitaires externes vétérinaires, dont le Frontline[®] de Merial. Ce produit est ainsi largement utilisé, dans un cadre domestique aussi bien que professionnel. Son large spectre lui permettant d'agir sur de nombreux parasites tels que les criquets, les fourmis, les cafards, les puces et les tiques [14], il est utilisé comme produit de désinsectisation, de traitement des semences, et de traitement des sols.

Découvert en 1984 et mis sur le marché en 1994, le fipronil reste largement utilisé actuellement, même si les produits qui en contiennent doivent posséder une autorisation de mise sur le marché. Sa possible implication dans la mortalité des abeilles a conduit au retrait des autorisations de mise sur le marché de plusieurs produits phytosanitaires en 2004. Une évaluation communautaire l'a finalement inscrit à l'annexe I de la directive 91/414/CEE des substances actives autorisées dans la composition des produits phytopharmaceutiques en tant qu'insecticide destiné au traitement des semences [2].

1.1. Aspects moléculaires

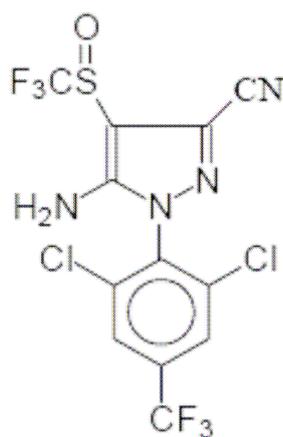


Figure 1 : Structure moléculaire du fipronil

Le fipronil, ou 5-Amino-1-[2,6-dichloro-4-(trifluorométhyl)phényl]-4-[(trifluorométhyl)sulfinyl]-1H-pyrazole-3-carbonitrile, se présente sous forme d'une poudre blanche. Il est soluble dans les solvants oxygénés, à savoir les alcools, les cétones et les esters [9]. Dans le Régent[®] par exemple, il est ainsi dilué dans du propylène glycol. Il s'agit d'une molécule photodégradable

1.2. Toxicocinétique

1.2.1. Absorption

L'absorption par voie cutanée est faible, de 0,04 à 0,2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ *in vivo* chez l'Homme [9]. Elle serait bien plus élevée par voie digestive, atteignant 90% chez le rat [2, 21].

1.2.2. Métabolisme

Le fipronil, comme tout xénobiotique, va subir des réactions de biotransformations destinées à l'éliminer de l'organisme. Ce processus est classiquement formé de trois grandes étapes : la phase I, d'oxydation, réduction ou hydrolyse, destinée à rendre le xénobiotique polaire ; la phase II, réaction de conjugaison à l'origine d'un composé hydrosoluble ; et enfin la phase III d'élimination.

Le métabolisme du fipronil, essentiellement hépatique, conduit à la formation de plusieurs métabolites, retrouvés dans le sang, la bile et les urines chez l'Homme [9]. La figure 2 représente les voies métaboliques caractérisées chez le rat.

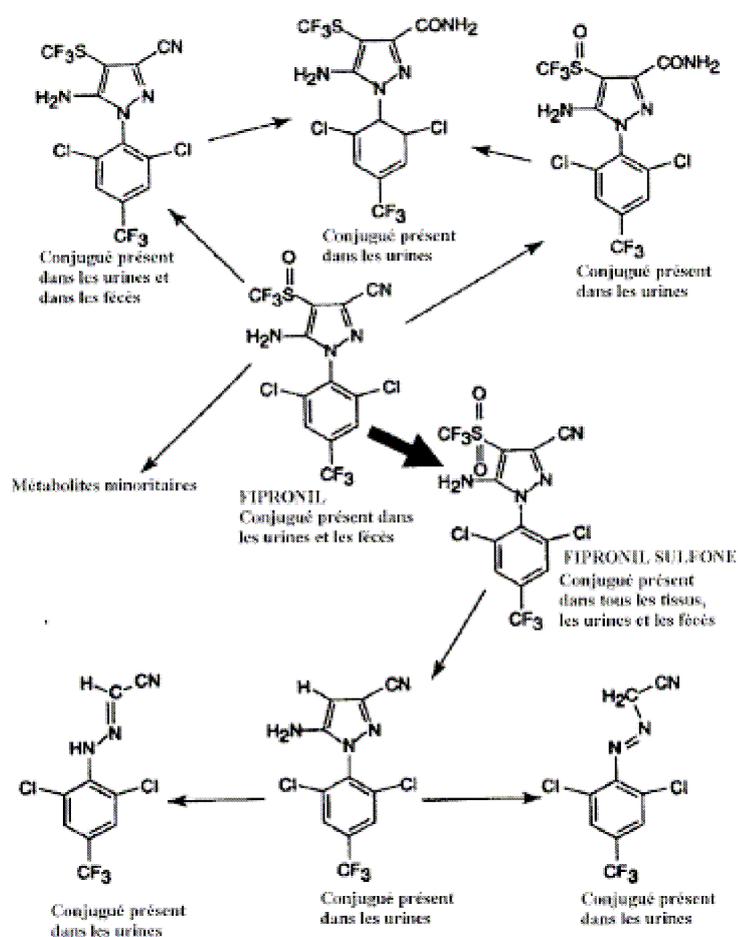


Figure 2 : Schéma métabolique du fipronil chez le rat [d'après TINGLE *et al.*, 2003]

La phase I est essentiellement assurée par les cytochromes P450 (CYP), qui sont des hémoprotéines localisées préférentiellement dans la membrane plasmique du réticulum endoplasmique lisse. Si 70% de ces cytochromes sont exprimés dans le foie, on en retrouve également dans les reins, les poumons, les intestins, la peau et le placenta.

Le fipronil sulfone, ou 5-amino-3-cyano-1-(2,6-dichloro-4-trifluorométhylphényl)-4-trifluorométhylsulfonylpyrazole, est le principal métabolite tissulaire chez l'Homme et le rat [83]. Il s'agit du produit de l'oxydation de la fonction sulfoxyde du fipronil par le cytochrome P450 [29]. Il semble que le sous type CYP 3A4 réalise environ 78 % de ces réactions, soit une activité cinq fois plus élevée que celle du sous type CYP 2C19 chez l'Homme, d'après une expérience *in vitro*. L'activité du CYP 3A4 nécessiterait la présence du cytochrome b5, co-exprimé dans la membrane microsomiale [83].

La phase II du métabolisme du fipronil correspond essentiellement à une glucuroconjugaison des métabolites, permettant par la suite une excrétion majoritairement biliaire, mais aussi urinaire.

1.2.3. Distribution

Le fipronil et ses métabolites se distribuent préférentiellement dans la graisse, et à moindre mesure dans le muscle, le rein et le foie. Des résidus sont également présents dans les surrénales, le pancréas, la thyroïde et les ovaires [21].

1.2.4. Elimination

L'élimination du fipronil et de ses métabolites est, chez le rat, essentiellement biliaire (de 45 à 75%) avec une élimination fécale, et urinaire (5 à 25%) [2]. Une partie importante des conjugués sécrétés dans la bile est réabsorbée au niveau de l'intestin grêle, à savoir jusqu'à 74 % chez les rats.

Le temps de demi-vie plasmatique du sulfone est estimé à environ 204 h dans l'espèce ovine [10]. Le temps de demi-vie du fipronil chez le mouton, quant à lui plus faible, est d'environ 33 h.

1.3. Effets délétères du fipronil chez les mammifères ?

Le développement de résistances crée continuellement le besoin de trouver de nouveaux pesticides, efficaces et sélectifs. Lors de sa mise sur le marché, le fipronil répondait en grande partie à ces critères, assurant à faible dose une protection de longue durée des cultures, et ayant l'avantage d'être particulièrement sélectif. L'indice de sécurité de ce produit, basé sur la forte différence d'affinité entre les récepteurs des cellules nerveuses des invertébrés et des mammifères, s'était en effet avéré particulièrement élevé.

1.3.1. Mécanisme d'action du fipronil

L'acide gamma-aminobutyrique (GABA) est le principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central. Il diminue en effet l'activité nerveuse des neurones sur lesquels il se fixe, par l'intermédiaire de trois types de récepteurs : les récepteurs métabotropes GABA_B, et les ionotropes GABA_A et GABA_C, ces derniers étant principalement situés dans la moelle épinière.

Les récepteurs GABA_A sont des polymères formant un pore de conduction pour les ions chlorures. Ils sont formés de cinq sous unités, chacune étant composée d'un domaine extra-membranaire présentant des sites de liaison à différentes molécules, notamment au GABA, et d'un domaine hydrophobe membranaire. Ces protéines appartenant à différentes familles, il existe de nombreuses possibilités d'assemblage. De manière générale, ces récepteurs sont plutôt homo-oligomères chez les insectes, et hétéro-oligomères chez les mammifères [39].

La fixation de deux molécules de GABA à ce type de récepteur est à l'origine, par réaction allostérique, d'une augmentation de la perméabilité aux ions chlorures, conduisant ainsi à une hyperpolarisation du neurone. Le seuil d'activation de la cellule est alors augmenté, rendant le passage d'un potentiel d'action plus difficile.

Le fipronil, en se fixant de façon réversible sur les récepteurs GABA_A, est un inhibiteur non compétitif du GABA. Il va ainsi diminuer l'entrée de chlorures dans les cellules, parfois jusqu'à engendrer une dépolarisation cellulaire. Il joue donc un rôle de neuro-excitateur, conduisant à une paralysie tonique puis à la mort de certains invertébrés.

Par ailleurs, une action du fipronil sur les canaux chlorures activés par le glutamate a récemment été mise en évidence. Ces canaux seraient en effet bloqués par le pesticide. Or, ce type de récepteur n'étant présent que dans les neurones des invertébrés, ce mécanisme expliquerait au moins en partie la toxicité sélective du fipronil pour les insectes, et son indice de sécurité important envers les mammifères [58, 95].

1.3.2. Neurotoxicité chez les mammifères

1.3.2.1. Signes cliniques suite à l'exposition au fipronil

D'après une enquête rétrospective, entre décembre 1994 et octobre 2003, 182 personnes ont été intoxiquées en Ile de France avec des produits contenant du fipronil [9].

1.3.2.1.1. Toxicité aiguë

Expérimentalement, une bradypnée, une diarrhée, des troubles de l'équilibre, des tremblements et des convulsions peuvent être observés chez les animaux. La DL₅₀ par voie orale est estimée à 97 mg/kg chez les rats [84]. Suite à une évaluation toxicologique, la dose sans effet (DSE) chez le rat a été fixée à 0,5 mg/kg/j en ce qui concerne la neurotoxicité [2].

Chez les humains, plusieurs cas d'intoxication aux produits contenant du fipronil ont été décrits, avec différents symptômes selon la voie de pénétration. On retrouve majoritairement des

signes neurologiques modérés, et des irritations digestives, respiratoires, cutanées, et oculaires. Le pronostic est favorable et les symptômes disparaissent le plus souvent en 3 à 4 jours. Toutefois, une étude menée au Sri Lanka rapporte le cas d'un homme de 23 ans décédé 17 jours après avoir ingéré 100 mL de Régent 50 SC[®], soit 5 g de fipronil, suite à plusieurs crises convulsives tonico-cloniques [55].

Dans de nombreux cas, il s'avère que la symptomatologie observée peut être expliquée par les solvants et/ou les adjuvants, le fipronil n'étant à l'origine de convulsions qu'en cas d'exposition importante.

Cependant, d'après le travail de Szegedi *et al.*, des rats exposés à une administration intragastrique unique à 100 mg/kg de fipronil, dose proche de la DL₅₀ déterminée par une autre équipe [84], présentent une excitabilité neuronale augmentée. Cet effet, léger et passager, a été mis en évidence par l'étude d'enregistrements électrophysiologiques *in vitro* et *in vivo*, et par des observations comportementales. Le fipronil et/ou ses métabolites pourraient donc interagir avec le système nerveux des mammifères, à l'origine de changements d'humeur et d'activité [82].

Le fipronil est par ailleurs à l'origine de plusieurs métabolites [84]. Dans beaucoup d'espèces étudiées, le fipronil sulfone semble être le métabolite majoritaire. Des études *in vitro* sur la capacité du fipronil et du fipronil sulfone à déplacer ou inhiber la liaison d'agonistes spécifiques, tel que l'EBOB, de leur site de liaison au récepteur GABA_A du système nerveux central des mammifères indiquent que l'IC₅₀ du fipronil serait approximativement 10 fois plus importante que celle de son métabolite sulfone [tableau 1, 28, 95]. Ces résultats suggèrent donc, en ce qui concerne les effets neurotoxiques liés à des interactions avec les récepteurs GABA, que le fipronil sulfone serait potentiellement plus puissant que le fipronil lui-même.

1.3.2.1.2. Toxicité à long terme

Expérimentalement, chez les rongeurs, le fipronil semble être cause d'hyperexcitabilité neurologique, d'hépatomégalie et de cytolyse hépatique modérée. Il favoriserait également l'apparition de carcinomes hépatocellulaires chez la souris, et d'hyperplasies et de tumeurs thyroïdiennes chez le rat [2].

La dose journalière admissible, c'est à dire la quantité de fipronil qu'un individu moyen de 60 kg peut théoriquement ingérer quotidiennement tout au long de sa vie sans risque appréciable pour la santé, a été fixée chez l'Homme à 0,2 µg/kg/j [21].

1.3.2.2. Mécanismes : interaction entre le fipronil et le système GABA des mammifères

Le fipronil se fixe de façon bien plus spécifique aux récepteurs GABA des insectes qu'à ceux des mammifères. Il existe de nombreux sous-types de récepteurs GABA_A, classés en fonction de la nature de leur sous unités, et la structure de ces récepteurs diffère de façon importante entre les invertébrés et les mammifères. La structure des récepteurs conditionne la capacité du fipronil à se lier à eux [68]. Ainsi, *in vitro*, l'affinité avec le récepteur homo-oligomère $\beta 3$ des insectes est bien supérieure à celle avec le récepteur hétéro-oligomère $\beta 3$ des mammifères [68, 69].

1.3.2.3. Neurotoxicité des métabolites du fipronil chez les mammifères

Le fipronil désulfinyl, résultant de la photodégradation du fipronil, est essentiellement retrouvé dans l'environnement [28]. La liaison du fipronil désulfinyl et du sulfone aux récepteurs GABA présents dans les cellules de la moelle épinière est moins sélective des invertébrés que pour le fipronil [29]. En effet, le taux de liaison du sulfone aux récepteurs GABA_A de la moelle épinière serait 7 fois plus élevé que celui du fipronil chez les mammifères [95].

Cependant, la composition des récepteurs est différente entre les récepteurs GABA présents dans la moelle épinière, et ceux présents dans le cerveau. Une étude portant sur les récepteurs GABA_A présents dans le cerveau des mammifères met d'ailleurs en évidence une toxicité plus faible du sulfone par rapport au fipronil [49], considérant ainsi la biotransformation en fipronil sulfone comme un processus de détoxification pour l'organisme.

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des affinités relatives du fipronil et du fipronil sulfone sur les récepteurs GABA des mammifères et des invertébrés, et sur les récepteurs glutamate des invertébrés.

Mammifères		Invertébrés				
Récepteurs GABA _A hétéro-oligomères		Récepteurs GABA _A homo-oligomères		Récepteurs glutamate		
Fipronil	Récepteurs GABA _A de moelle épinière de rat : IC₅₀=1103nM ^(b)		Récepteurs de mouche domestique : IC₅₀=3-12nM ^(b)		Affinité élevée.	
	Récepteurs natifs du cerveau chez l'Homme : IC₅₀=2470nM ^(c)		Récepteurs homo-oligomères recombinants, avec sous-unités β ₃ : IC₅₀=0,5-2,4nM ^(c)			
Sulfone	Récepteurs non activés	Récepteurs activés	Récepteurs non activés	Récepteurs activés	Récepteurs non activés	Récepteurs activés
	IC₅₀=70,2±3,9nM (n=5) ^(a)	IC₅₀=20nM (n=4-7) ^(a)	Récepteur de cafard : IC₅₀=53,7±8,0nM (n=4-5) ^(a)	Récepteur de cafard : IC₅₀=15,4±2,1nM (n=5) ^(a)	Récepteur de cafard : IC₅₀=31,2±4,1nM (n=3-5) ^(a)	Récepteur de cafard : IC₅₀=8,8±1,1nM (n=3-5) ^(a)

(a): Etude selon la technique de patch-clamp, sur cellules nerveuses de cafard et de rat (moelle épinière) [95].

(b): Etude selon le déplacement [³H]EBOB, sur cellules de mouche domestique, souris, chien, poulet, saumon [29].

(c): Etude selon le déplacement [³H]EBOB, sur cellules cérébrales humaines, et sur récepteurs recombinant [68, 69].

1.3.3. Fipronil et métabolisme hépatique

Il a été montré que le fipronil était capable d'agir sur la synthèse de certaines enzymes hépatiques. Chez l'Homme, il induirait ainsi la transcription de l'ARNm de différents cytochromes, tels que les CYP 3A5 et CYP 2B6, de façon faible, mais aussi du CYP 1A1 avec un effet dose-dépendant jusqu'à 25 μM, et du CYP 3A4 jusqu'à 1μM, concentration au-delà de laquelle l'induction diminue [14]. Or les CYP 3A4 et CYP 2B6 sont souvent co-régulés par une activation du récepteur hPXR (human pregnane X receptor), ce qui laisse suggérer une activation de ce dernier par le fipronil. Il s'agit d'un récepteur nucléaire, se dimérisant le plus fréquemment avec un retinoid X receptor, ce qui lui permet d'agir au niveau des gènes codant pour différents CYP.

Le sous type CYP 3A4, le plus abondant dans le foie humain, intervient dans la biotransformation de nombreux composés, dont celle du fipronil lui-même. Le métabolisme du fipronil pourrait ainsi interagir avec celui d'autres molécules, soit en jouant un rôle de compétiteur auprès des cytochromes, soit en augmentant le catabolisme de ces molécules du fait de son effet inducteur. Le fipronil inhibe ainsi, par exemple, la 6β-hydroxylation de la

testostérone, ainsi que la n-déméthylation du diazepam [83]. Par ailleurs, le fipronil étant lui-même un substrat du CYP 3A4, il induirait ainsi son propre catabolisme.

Le fipronil présenterait de plus un effet cytotoxique, dose et temps-dépendant, sur les hépatocytes [14]. Ceci pourrait être médié par l'augmentation de l'activité des caspases 3 et 7 dans les hépatocytes humains, ces caspases étant des protéases jouant un rôle essentiel dans les phénomènes d'apoptose et de nécrose.

Le sulfone, principal métabolite du fipronil, est lui aussi cytotoxique. Il est en effet capable d'induire l'activité des caspases dans des hépatocytes humains, de façon plus rapide que le fipronil [14].

Le fipronil, pesticide provoquant une paralysie tonique et ainsi la mort de certains invertébrés, serait donc capable d'affecter le métabolisme des mammifères. Si l'action neurologique semble assez spécifique des invertébrés, son impact au niveau du foie, ainsi que sur l'équilibre des systèmes endocriniens dont les hormones sont métabolisées au niveau hépatique, paraît plus inquiétant. Ainsi une toxicité thyroïdienne a été rapportée chez le rat, avec une possible implication dans l'apparition de tumeurs dans cette espèce.

2. Perturbation thyroïdienne et xénobiotiques

2.1. Différents mécanismes possibles de la perturbation thyroïdienne

Différentes molécules, issues de l'industrie chimique et de l'agriculture notamment, peuvent interagir avec la fonction thyroïdienne, et ce à tous les niveaux de l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien.

Le 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD), appartenant à la famille des dioxines, entraîne une diminution des concentrations de thyroxine (T_4) chez les rats, régulièrement accompagnée d'une augmentation de la concentration plasmatique en thyroid-stimulating hormone (TSH), ce qui favoriserait l'hyperplasie de la thyroïde [59]. De nombreux composés seraient, de même, responsables d'une diminution de la thyroïdémie, tels que le di-*n*-butyl phtalate ou l'acétate de cyprotérone chez le rat [60], l'hexachlorobenzène [57], ou encore le phénobarbital [36]. Certains médicaments, comme les glucocorticoïdes, la rifampicine et certains anti-inflammatoires non stéroïdiens, altèrent également la fonction thyroïdienne chez le chien [13].

2.1.1. Effets directs sur la thyroïde

La synthèse des hormones thyroïdiennes nécessite un important apport d'iode, prélevée dans le sang par un système de symporteur Na^+/I^- , le natrium iodide symporter (NIS), situé sur la membrane des cellules folliculaires de la thyroïde. Plusieurs substances peuvent interférer avec la capture de l'iode, telles que le perchlorate (ClO_4^-), le thiocyanate (SCN^-), le 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD), et le PCB-126, qui inhibent le NIS [65, 88].

D'autres molécules sont capables d'affecter la synthèse même des hormones thyroïdiennes, par action sur la thyroperoxydase (TPO). Cette enzyme joue en effet un rôle majeur dans la synthèse des monoiodotyrosine (MIT) et diiodotyrosine (DIT), ainsi que dans la formation des hormones T_3 et T_4 par fusion de ces composés. Certaines substances chimiques inhibent l'activité de la TPO, telles que le propylthiouracil et le méthimazole, deux molécules d'ailleurs utilisées dans le traitement de l'hyperthyroïdie.

2.1.2. Interaction avec les protéines de transport

2.1.2.1. Les protéines de transport

Dans les conditions physiologiques, du fait de leur caractère apolaire, la plus grande partie des hormones thyroïdiennes circule dans le plasma en étant liée à des protéines de transport. La concentration plasmatique en hormones libres, notée fT_4 pour la thyroxine et fT_3 pour la triiodothyronine, représente ainsi pour un Homme respectivement environ 0,03 % de la concentration plasmatique totale en thyroxine, notée TT_4 , et 0,3% de TT_3 [73].

Différents transporteurs existent, les principaux étant la thyroxine-binding globulin (TBG), la transthyréline (TTR) encore appelée thyroxine-binding prealbumine (TBPA), et l'albumine, notée HSA pour human serum albumine. Bien que d'autres protéines soient capables de se lier avec les hormones thyroïdiennes, telles que les apolipoprotéines ou les immunoglobulines M, leur contribution est négligeable, que ce soit dans des conditions physiologiques ou pathologiques [5].

L'albumine est la protéine de transport la plus abondante dans le plasma, puisque sa concentration est égale à 100 fois celle de la TTR, et 2 000 fois celle de la TBG chez l'Homme. Cependant la TBG a une constante d'affinité avec la thyroxine bien supérieure à celle des autres transporteurs, 50 fois plus élevée que celle de la TTR et 7 000 fois plus importante que celle de l'albumine. C'est pourquoi, malgré sa plus faible concentration, la TBG lie environ 75 % de la thyroxine plasmatique, tandis que la TTR et l'albumine ne fixent que respectivement 20 % et 5 % chez un homme sain [70]. Le Tableau 2 récapitule les données pour ces trois transporteurs.

	TBG	TTR	HSA
Poids moléculaire (k daltons)	54	55	66,5
Concentration plasmatique (mg/L)	16	250	40 000
Nombre de sites de liaison pour T₄ et T₃	1	2	Grand nombre
Constante d'association K_a (mol ⁻¹)		<i>(Valeurs données pour le site ayant la plus grande affinité pour T₄)</i>	
Avec T ₄	1.10 ¹⁰	2.10 ⁸	1,5.10 ⁶
Avec T ₃	1.10 ⁹	1.10 ⁶	2.10 ⁵
Pourcentage d'hormones plasmatiques liées			
T ₄	75	20	5
T ₃	75	<5	20

Tableau 2 : Quelques propriétés et paramètres des principales protéines de transport des hormones thyroïdiennes dans le plasma chez l'Homme [REFETOF, Thyroid hormone serum transport proteins]

L'équilibre entre la fraction d'hormone libre (fT₃ et fT₄) et la fraction liée aux protéines dans le plasma est régi par les constantes d'affinité des différentes protéines de liaison aux hormones. Le maintien de cet équilibre permet de préserver une concentration en fT₃ et fT₄ à peu près constante, et ainsi protège l'organisme des rapides variations de sécrétion d'hormones.

L'action biologique des hormones thyroïdiennes est déterminée par la concentration intracellulaire en T₃ disponible pour lier les récepteurs nucléaires. Les hormones thyroïdiennes non liées à des protéines plasmatiques sont directement disponibles pour les différents tissus, par diffusion membranaire passive : il s'agit de la fraction dite active.

En outre, des protéines de transport membranaire ont récemment été mises en évidence, constituant un système actif pour le passage transmembranaire des hormones thyroïdiennes liées à l'albumine, et du complexe TBG-T₃ [62, 63]. Différents transporteurs membranaires ont été caractérisés, et leurs localisations, finement régulée au sein de l'organisme, permettraient une distribution plus spécifique des hormones au niveau de certains tissus, notamment le foie et le cerveau [33].

2.1.2.2. Perturbateurs endocriniens et protéines de transport

Par analogie structurale, certaines molécules peuvent entrer en compétition avec les hormones thyroïdiennes pour la fixation sur les protéines de transport, la TTR notamment. C'est le cas des PCB et de leurs dérivés hydroxylés, et des phtalates, conduisant chez le rat à une diminution des concentrations plasmatiques totales des hormones thyroïdiennes [87]. La liaison de la T₄ à la TBG ne semble pas, en revanche, être modifiée *in vitro* par la présence des dérivés hydroxylés des PCB [43].

2.1.3. Effet sur les récepteurs aux hormones thyroïdiennes

La T₃, après passage de la membrane plasmique, se lie à des récepteurs cytosoliques. L'ensemble T₃-récepteur est alors capable de se dimériser avec un second récepteur, le plus souvent un "retinoid X receptor", et agit directement sur l'ADN par liaison au niveau de sites spécifiques, les thyroid response element (TRE).

Certains xénobiotiques sont capables de se fixer aux récepteurs des hormones thyroïdiennes, tels que les dérivés hydroxylés des PCB, qui exercent alors des effets similaires à la T₃ [41]. Le bisphenol-A (BPA) jouerait quant à lui un rôle d'antagoniste suite à sa liaison aux récepteurs [98]. Le PCB, en revanche, ne semble pas capable d'interagir lui-même avec ces récepteurs [25], mais favoriserait l'expression de certains gènes codant pour des récepteurs d'hormones thyroïdiennes [24].

2.1.4. Effet sur le métabolisme des hormones thyroïdiennes

Les hormones thyroïdiennes vont subir plusieurs transformations, d'une part dues à l'action des désiodases qui vont pouvoir activer la T₄ en T₃ ou désactiver les hormones thyroïdiennes en forme peu active. D'autre part, la glucuronoconjugaison et la sulfoconjugaison vont permettre l'excrétion des ces molécules.

2.1.4.1. Les désiodases

Les désiodases sont des sélénoprotéines réparties dans l'ensemble de l'organisme, permettant de réguler l'activité des hormones thyroïdiennes. Elles sont capables d'activer ou d'inactiver ces hormones selon leur site d'action au sein de la molécule, respectivement le noyau phénolique ("externe") ou benzénique ("interne"). Leur action est loin d'être négligeable, puisque,

dans l'espèce ovine, au moins 50 % de la T_3 plasmatique et 97 % de la rT_3 proviennent de la monodéiodination de la T_4 dans les tissus périphériques [3, 85].

On distingue trois types de désiodases, chacune étant caractérisée par son mode d'action et sa répartition parmi les différents tissus. Le type I (D1), présent dans le foie, le rein et la thyroïde, est capable d'agir sur le noyau phénolique, permettant la production de T_3 , mais aussi dans une certaine mesure sur le noyau benzénique, synthétisant ainsi de la rT_3 à partir de la thyroxine. Elle intervient également dans le catabolisme de la T_3 . L'activité de cette enzyme est inhibée par le 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) [7].

Le type II se retrouve plus particulièrement dans l'hypophyse, le cerveau, et le tissu adipeux [7]. Chez l'Homme, il s'agit de la principale source de formation de T_3 à partir de la T_4 [51]. Chez le rat, elle participe à la synthèse de 75 % de la T_3 présente dans le tissu cérébral [75]. Cette enzyme est localisée dans la membrane du réticulum endoplasmique.

Le type III, quant à lui, inactive la T_3 , et peut également prévenir l'activation de T_4 par formation de rT_3 . Il se situe en plus grandes concentrations dans le cerveau, la peau et le placenta, et serait la principale voie d'élimination de la T_3 [7].

L'expression des désiodases serait contrôlée en partie par les hormones thyroïdiennes, la T_3 principalement [4, 40]. La thyroxine et la rT_3 accélèrent la dégradation de la désiodase de type II [40]. L'expression du gène de la désiodase II serait par ailleurs contrôlée par la photopériode, au moins chez la chèvre [94].

Les activités relatives de ces désiodases, finement régulées par action sur leur synthèse et leur dégradation, permettent d'agir localement sur le ratio T_3/rT_3 , et ainsi de modifier la concentration plasmatique de T_3 sans faire intervenir l'axe thyroïdienne [85].

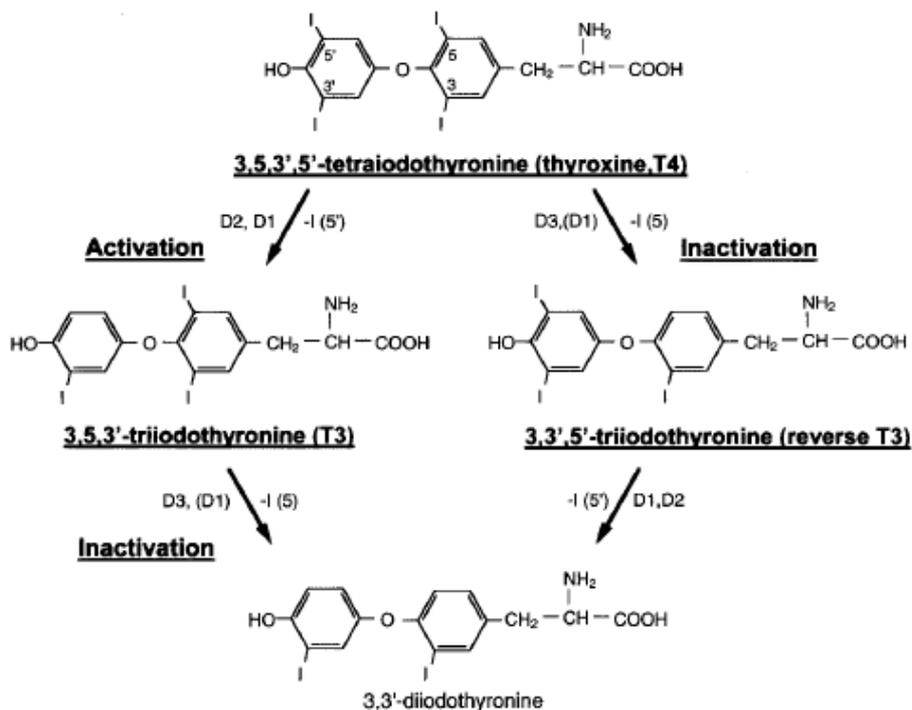


Figure 3 : Structures et relations entre les principales iodothyronine activées ou désactivées par les désiodases (d'après BIANCO *et al.*, 2002)

L'activation de la T₄ en T₃ est catalysée majoritairement par la D2, et aussi par la D1. Cette dernière est également capable d'inactiver la T₄ en rT₃, bien que la D3 soit l'enzyme principale de cette voie.

2.1.4.2. Le catabolisme hépatique [11]

La production quotidienne de thyroxine, chez l'Homme, est estimée entre 82 et 93 µg. Diverses études ont conclu que, par désiodation, environ 40 % est transformé en T₃, et en moyenne 39 % en rT₃. Il existe donc d'autres voies cataboliques, suivies par les 20 % de thyroxine restants.

2.1.4.2.1. Glucuroconjugaison

Si elle se déroule majoritairement dans le foie, la glucuroconjugaison peut également avoir lieu dans les reins et les intestins. Elle est catalysée par l'uridine diphosphoglucuronosyltransférase (UDPGT), enzyme microsomale hépatique située dans la membrane du réticulum endoplasmique. Trois isoenzymes ont été mises en évidence chez le rat [88]. Chez

l'Homme, l'isoenzyme UDPGT 1A1 semble fortement prépondérante, et particulièrement importante dans le catabolisme de la rT_3 [22].

Toutes les iodothyronines – T_4 , T_3 , rT_3 , diiodothyronines et monoiodothyronines- peuvent subir cette réaction, mais cette voie serait mineure pour la T_3 chez l'Homme. Les conjugués produits sont excrétés par la bile principalement.

Chez le rat, le phénobarbital, la pregnenolone-16 α -carbonitrile (PCN) et le 3-méthylcholanthrene, induisent la glucuroconjugaison de la thyroxine, et conduisent à une diminution de la concentration plasmatique en T_4 [35]. De même, le TCDD est inducteur de l'UDPGT 1 [78].

2.1.4.2.2. Sulfoconjugaison

Comme la glucuroconjugaison, elle facilite l'excrétion biliaire et se déroule principalement dans le foie, où elle est en revanche catalysée par les phénolsulfotransférases cytosoliques. Les diiodothyronines, 3-3' notamment, seraient majoritairement catabolisées par cette réaction de sulfoconjugaison.

Cette voie catabolique est en étroite relation avec les désiodations. En effet, il a été démontré, chez le rat et l'Homme, que les iodothyronines sulfatées sont plus facilement désiodées [11].

Les polychlorobiphényles (PCB) sont reconnus comme étant de puissants inhibiteurs des sulfotransférases *in vitro*, leur activité aurait cependant peu d'impact *in vivo* [91].

2.1.4.2.3. Autres voies cataboliques

D'autres voies ont été décrites, telles que la dégradation en analogues d'acide acétique, ou la dégradation oxydative qui permet de rompre la liaison éther des iodothyronines. Leur importance semble limitée.

2.1.4.3. Le cycle entéro-hépatique

Les thyronines sulfo- et glucuroconjugées, excrétées dans la bile, peuvent être hydrolysées par des bactéries de la flore intestinale. Les thyronines produites sont ainsi plus facilement réabsorbées, et sont retrouvées dans le plasma.

De nombreux xénobiotiques interagissent donc avec la fonction thyroïdienne, et ce à différents niveaux de production, d'action et d'élimination ces hormones. Parmi eux, le fipronil, objet de notre étude, a été identifié suite aux évaluations toxicologiques réglementaires conduites chez le rat, comme un perturbateur thyroïdien potentiel.

2.2. Cas du fipronil : schéma physiopathologique proposé chez le rat

Chez le rat, un traitement au fipronil, à 17mg/kg par jour pendant 91 semaines, est associé à une diminution de la concentration plasmatique en T₄, concomitamment d'une augmentation plasmatique de la concentration en TSH, et associé à une augmentation significative de l'incidence des tumeurs thyroïdiennes [21]. Une hypertrophie cellulaire et une augmentation de la masse de la thyroïde sont d'ailleurs décrites suite à l'exposition à ce pesticide [37].

2.2.1. Fipronil et métabolisme hépatique des hormones thyroïdiennes chez le rat

L'évolution de la thyroxinémie suite à une exposition au fipronil s'expliquerait par une augmentation de la clairance de la T₄, plutôt que par une diminution de sa production [37]. La demi-vie de la T₄, totale et libre, s'avère en effet significativement plus faible chez les rats traités au fipronil (14 mg/kg par jour pendant 14 jours) que dans le groupe témoin [47].

Le fipronil serait capable d'induire des enzymes hépatiques, et ce à plusieurs niveaux. Ainsi, la clairance de l'antipyrine, biomarqueur permettant d'évaluer l'activité des enzymes de phase I, est-elle significativement plus élevée chez des rats traités au fipronil [47]. Ce pesticide augmenterait donc l'activité des CYP, et ce possiblement par action directe sur l'expression de leurs gènes [14]. Par ailleurs, une action sur une UDPGT a également été mise en évidence chez le rat : le fipronil augmenterait l'activité de la 4-nitrophénol UDPGT, elle-même représentative de l'activité des UDPGT envers la T₄ [47].

Le fipronil serait donc capable d'agir sur plusieurs systèmes hépatiques, dont l'UDPGT responsable du catabolisme d'une grande partie des hormones thyroïdiennes. Une action à d'autres niveaux du catabolisme de ces hormones, tels que les désiodations ou la sulfoconjugaison, ne peut par ailleurs être exclue.

2.2.2. Fipronil, concentration plasmatique en TSH et action au niveau de la thyroïde

L'augmentation des concentrations plasmatiques en TSH suite à l'exposition au fipronil serait une conséquence de l'évolution des concentrations en hormones thyroïdiennes. La diminution des concentrations en T_3 et T_4 conduit en effet à une diminution du rétrocontrôle négatif, par ces hormones, sur l'axe thyroïdienne.

Lors d'exposition chronique au fipronil, la concentration en TSH reste donc élevée sur du long terme. Cette stimulation prolongée de la thyroïde pourrait être à l'origine d'hypertrophie et/ou d'hyperplasie cellulaire. Ce phénomène est réversible, au moins au début, si l'exposition au pesticide cesse. Si le stimulus persiste, il peut conduire à l'apparition de tumeurs bénignes puis malignes de la thyroïde. Ceci peut s'expliquer par un "emballement" du cycle cellulaire sous l'action de la TSH, augmentant la probabilité de mutations spontanées, potentiellement carcinogènes. Une relation a d'ailleurs été significativement établie, chez l'Homme, entre une concentration plasmatique élevée, même faiblement, de TSH, et l'incidence des cancers thyroïdiens. Il y aurait également un impact de la concentration en TSH sur le degré de différenciation de ces tumeurs [32].

2.3. Remise en question du modèle rongeur : TBG et protection

2.3.1. Structure et fonction de la TBG

La thyroxine-binding globuline (TBG) est la principale protéine de transport plasmatique des hormones thyroïdiennes chez l'Homme et les ovins. Elle joue ainsi un rôle important dans le métabolisme et l'action de ces hormones iodées.

La TBG possède une affinité particulièrement élevée avec la thyroxine. Elle est cependant capable de lier, à une moindre mesure, les iodothyronines T_3 et rT_3 , l'acide tétraiodoacétique, ainsi que d'autres molécules telle que l'acide salicylique [44].

2.3.1.1. Structure

La TBG est un monomère synthétisé dans le foie, composé de 395 acides aminés et 4 hétéro saccharides, chacun porteur d'acides sialiques terminaux. Cette molécule appartient à la superfamille des serine protease inhibitors (SERPIN), regroupant des protéines avec des structures similaires, liées à une séquence qui a tout d'abord été caractérisée par ses propriétés

inhibitrices de protéases. Il s'avère finalement que toutes les SERPINs ne sont pas inhibitrices, c'est le cas de la TBG.

Cette sialoglycoprotéine lie T_4 dans une "poche", par une série d'interactions hydrophobes et de ponts hydrogènes. Elle est capable de lier et de relâcher le ligand sans être clivée, par un changement de conformation, d'après le modèle de Grasberger [25]. Cette transition réversible d'une forme de haute affinité à une forme de base affinité serait due à la présence d'une proline dans le site réactif, l'empêchant de rentrer complètement et irréversiblement au cœur du feuillet β principal, comme c'est le cas pour la plupart des autres SERPINs [96].

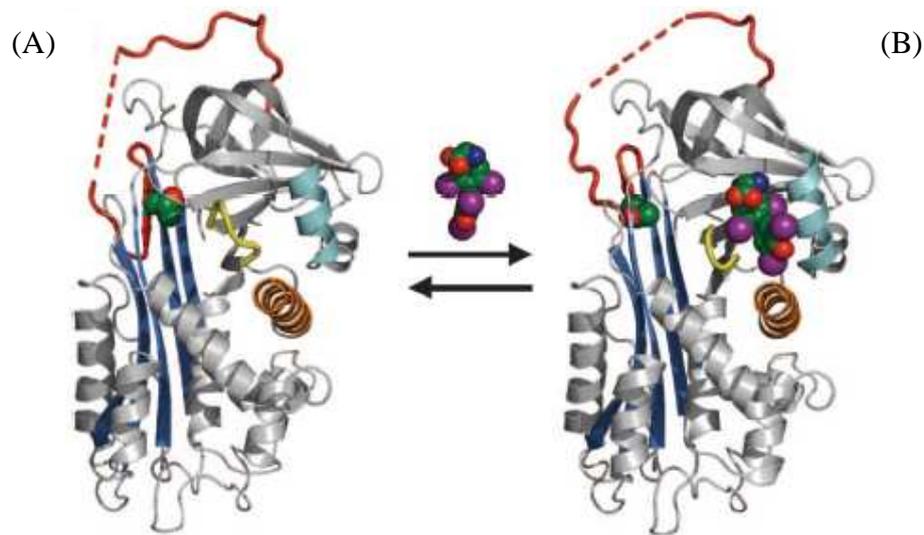


Figure 4 : Schéma de l'équilibre de conformation "en flip-flop" de la TBG [d'après ZHOU *et al.*, 2006]

La TBG, grâce à une modification de conformation, peut lier réversiblement la thyroxine.

(A) : TBG non liée à la T_4 . (B) : La T_4 est liée avec la TBG par des interactions hydrophobes et des ponts hydrogènes. La présence d'une proline dans le site réactif permet la réversibilité de cette liaison.

Une forme désyalisée de la TBG a été plus récemment mise en évidence, il s'agit de la "slow TBG" (STBG). L'affinité de cette molécule pour la T_4 est 10 fois inférieure à celle de la TBG, et sa concentration dans le sérum est bien plus faible [74]. En cas de cirrhose, sa concentration augmente, dû au fait que son élimination est principalement hépatique [52]. La STBG serait un premier catabolite de la TBG, rapidement éliminé par le foie [71]. Son temps de demi-vie est donc inférieur à celui de la TBG, qui est de 5 jours chez l'Homme [72].

2.3.1.2. Rôles

La TBG est la principale protéine de liaison chez l'Homme, à l'origine d'un ratio TT_4/fT_4 élevé. Il est couramment admis que ce fort taux de liaison aux protéines plasmatiques permettrait de limiter la clairance de la T_4 , et pourrait ainsi expliquer son temps de demi-vie élevé, à savoir d'environ 6 jours chez l'Homme [77] et 1,5 jours dans l'espèce ovine [23]. Ce temps de demi-vie est bien plus faible chez des espèces dépourvues de TBG, au moins à l'âge adulte. Il est ainsi estimé à 14 heures chez le rat [62], et à 2 heures chez le lapin [8].

La concentration totale de T_4 dans le plasma aurait tendance à être plus élevée chez les espèces possédant une TBG à haute capacité de liaison, que chez celles sans TBG ou avec une TBG de moindre capacité, comme illustré dans le tableau ci-dessous [46]. Ceci peut s'observer chez l'Homme également, au travers de personnes atteintes de déficience héréditaire en TBG. Ces patients sont pourtant cliniquement euthyroïdiens [46]. On observe chez eux des concentrations en fT_3 et fT_4 semblables à celle des personnes présentant une concentration usuelle en TBG, mais des concentrations plasmatiques totales diminuées. Ainsi, malgré les différences intra- et interspécifiques de concentration et d'affinité des différentes protéines de transport, les concentrations en hormones libres restent relativement constantes entre les espèces (Tableau 4).

L'équilibre entre les hormones liées et les hormones libres, régi par la loi d'action de masse, est rapide. La TBG permettrait donc la création d'un "réservoir" de T_4 dans le plasma, stabilisant ainsi la concentration en hormones thyroïdiennes libres au niveau des tissus.

	Concentration plasmatique en TT_4 (nmol/L)	Capacité de liaison de la TBG (nmol/L)	T_4 liée à la TBG (%)
Homme	93	600	72
Brebis	83	-	86
Singe	56	450	59
Cheval	22	250	61
Chien	29	150	60

Tableau 3 : Concentration plasmatique en TT_4 chez différentes espèces, en fonction de la capacité de liaison de la TBG envers la thyroxine [D'après LARSSON *et al.*, 1984]

	Nombre d'individus	Protéines totales (g/L)	TT₄ (ng/mL)	fT₄ (pg/mL)	Fraction libre de T₄
Homme	1	74	62	25	0,04%
Ovin	2	62,5 [52-73]	36,5 [32-41]	17,5 [13-22]	0,05%
Rat	4	66 [62-72]	37,8 [34-43]	24 [21-26]	0,06%

Tableau 4 : Profils thyroïdiens chez l'Homme, les ovins et le rat [D'après REFETTOFF *et al.*, 1970]

De plus, la TBG peut libérer une quantité importante de T₄, indépendamment du contrôle homéostatique des hormones thyroïdiennes, sous l'action de protéases libérées par les leucocytes au niveau des sites d'inflammation. L'action de ces enzymes va ainsi permettre une concentration localement élevée en thyroxine, à une valeur telle qu'elle pourrait avoir une action bactéricide et cytotoxique [77].

2.3.1.3. Régulation

La concentration plasmatique de la TBG dépendrait de celle des hormones thyroïdiennes. Ainsi des tendances se dégagent selon le statut thyroïdien : un hyperthyroïdisme serait associé à une diminution de la concentration en TBG, de $18,4 \pm 2,72$ mg/L chez les femmes euthyroïdiennes à $15,5 \pm 2,5$ mg/L chez les femmes hyperthyroïdiennes, et un hypothyroïdisme à une augmentation de cette concentration, à $21 \pm 4,0$ mg/L [66, 80]. Il a d'ailleurs été montré, chez le rat, que la T₃ exerce un contrôle négatif sur la synthèse de la TBG [77].

Les hormones sexuelles ont également une influence sur la concentration en TBG, puisque, chez l'Homme, elle est augmentée par les oestrogènes [15] et diminuée par les androgènes.

Par ailleurs, la concentration plasmatique en TBG varie en fonction de l'âge du sujet : elle est plus élevée chez le fœtus et le nouveau-né que chez l'adulte. Ce phénomène serait dû à une diminution de synthèse plutôt qu'à une augmentation de clairance. Chez le rat, cette évolution est particulièrement importante, la TBG disparaissant à l'âge adulte et réapparaissant chez le rat sénéscent [74, 90].

2.3.2. Différences interspécifiques d'expression de la TBG

La TBG n'a pas été mise en évidence chez toutes les espèces, même chez certains mammifères : le chat, le lapin, et le rat en seraient dépourvus, au moins à l'âge adulte [46]. Dans certaines espèces, des transporteurs proches de la TBG existent, comme par exemple chez le poulet, où une protéine de transport comparable à la TBG humaine, haute affinité faible capacité, a été mise en évidence [6], bien que LARSSON *et al.* l'apparentent plutôt à un complexe TBPA-RBP. Dans d'autres espèces, la TBG présente des caractéristiques plus proches de celle de l'Homme. C'est notamment le cas des bovins et des ovins [73].

Ces différences interspécifiques ne s'observent pas seulement pour la TBG, mais aussi pour les autres protéines de transport des hormones iodées. Comme présenté dans le Tableau 5, les protéines de transport chez l'Homme sont plus proches de celles des ovins que de celles des rats.

	TBG	TTR	Albumine
Constante de dissociation pour T₄ (Kd) (nmol/L)			
Homme	0,105	6,25	2780
Ovins	0,112	7,14	2860
Rat	-	2,78	1540
Capacité de liaison maximale pour T₄ (Bmax) (nmol/L)			x 10 ⁶
Homme	266,6	3229,6	51,3
Ovins	160	4494	35,2
Rat	-	1968,2	30,2
Pourcentage de T₄ liée (%)			
Homme	73,3	18,9	7,8
Ovins	53,1	35,6	11,3
Rat	-	85,1	14,8

Tableau 5 : Caractéristiques des protéines de transport chez trois espèces [D'après SUHERLAND, 1975]

La TBG, principale protéine de transport des hormones thyroïdiennes chez l'Homme, joue donc un rôle prépondérant dans l'organisme, particulièrement en tant que réservoir, et en tamponnant les variations brutales des concentrations plasmatiques en hormones libres. Sa liaison aux hormones thyroïdiennes va par ailleurs influencer leurs paramètres pharmacocinétiques.

Cette protéine n'étant pratiquement pas présente chez le rat adulte, cet animal semble peu adapté en tant que modèle expérimental pour l'Homme.

2.4. Effet du fipronil sur un modèle ovin : premières études

Afin d'étudier l'effet du fipronil sur la physiologie thyroïdienne dans un modèle plus proche de celui de l'Homme, il a été décidé de travailler sur des ovins. La clairance de la thyroxine suite à l'exposition au fipronil a pu être mesurée en dosant la cinétique de TT_4 sur des animaux thyroïdectomisés. Elle ne semble d'après cette étude nullement affectée par le traitement au fipronil.

Les résultats obtenus peuvent toutefois être biaisé par le modèle animal choisi, puisqu'il est probable que le statut hypothyroïdien de ces animaux ait été de nature à influencer leur métabolisme. En effet, les hormones thyroïdiennes régulent le métabolisme basal de l'organisme. En cas de déséquilibre, de multiples conséquences, cliniques ou subcliniques, vont être observées.

En ce qui concerne le métabolisme des hormones thyroïdiennes, l'expression des désiodases est en partie contrôlée par les hormones thyroïdiennes elles-mêmes. L'expression du gène de la désiodase de type II, notamment, voit sa transcription inhibée par la T_3 . La rT_3 , au contraire, va légèrement augmenter la transcription de ce gène, mais diminuer fortement l'activité de cette enzyme en favorisant son élimination [40]. En cas d'hypothyroïdie, l'inhibition par la T_3 étant moins marquée, la désiodase de type II catalyse une fraction plus importante des désiodisations extra-thyroïdiennes de la T_4 en T_3 : de 66 % chez un euthyroïdien, à 70 % chez un hypothyroïdien [51]. Ce rapport tombe à 30 % en cas d'hyperthyroïdie.

Les hormones thyroïdiennes, la T_3 particulièrement, réguleraient par ailleurs l'expression des gènes codant pour les UDPGT 1 chez le rat [53]. En effet, la triiodothyronine stimulerait la synthèse de leur ARNm. Il s'agirait ainsi d'une autorégulation des hormones thyroïdiennes, puisqu'une augmentation de la concentration plasmatique en T_3 favoriserait le catabolisme de la T_4 [53, 88].

Outre les effets potentiels du statut thyroïdien sur les voies métaboliques des hormones thyroïdiennes chez ces animaux, on peut s'interroger sur les effets potentiels sur le métabolisme du toxique, et partant sur l'exposition de ces animaux au fipronil et à ses métabolites. D'après plusieurs études cliniques, le métabolisme oxydatif des médicaments et des stéroïdes, réalisé majoritairement par les cytochromes P450 dans le foie, serait perturbé lors de déséquilibre de la concentration plasmatique en T_3 . En effet, la T_3 exercerait un contrôle négatif sur l'expression de certains gènes CYP. L'expression du CYP 3A4, le principal cytochrome P450 dans le foie humain, serait particulièrement sensible à cette régulation, contrairement à d'autres tels que les CYP 2C9 et 2E1 [50, 61]. Or il a été vu précédemment que le CYP 3A4 est le principal

cytochrome intervenant dans la biotransformation du fipronil. Une modification de son expression pourrait alors avoir des conséquences sur le métabolisme de ce pesticide, et donc sur le schéma d'exposition des animaux.

3. Objectifs de travail

Des études menées au laboratoire de l'UMR 181 mettent nettement en évidence, chez le rat, une augmentation de la clairance de la T_4 lors d'exposition au fipronil [47]. Cette observation ne peut toutefois pas être extrapolée à l'Homme, étant donné les fortes différences au niveau de la physiologie thyroïdienne entre ces deux espèces. Le modèle ovin, exprimant la TBG, semble plus adapté, mais les résultats obtenus jusqu'alors sur des animaux thyroïdectomisés sont à considérer avec précaution compte tenu du statut hypothyroïdien des animaux.

Ces observations ont conduit à développer un nouveau modèle, dans le but d'étudier l'effet du fipronil chez des ovins euthyroïdiens. Ce travail a consisté à évaluer l'impact du fipronil, d'une part sur les profils thyroïdiens d'animaux à thyroïde intacte ; et d'autre part sur la clairance de la T_4 chez des ovins euthyroïdiens. Cette dernière manipulation nécessite la mise en place d'un modèle physiologique, malgré la suppression de la sécrétion des hormones thyroïdiennes endogènes.

CHAPITRE II. Partie expérimentale

Les expériences présentées ici ont pour objectif de réévaluer la toxicité thyroïdienne du fipronil chez l'ovin, plus pertinent que le rat en ce qui concerne la régulation de la fonction thyroïdienne.

1. Matériels et méthodes communs aux deux expériences

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

1.1. Animaux et prélèvements sanguins

Des brebis de race Lacaune et des béliers croisés ont été achetés au Domaine de la Fage, INRA, France. Tous ces animaux ont entre 1 et 2 ans, afin de s'affranchir de tout biais lié à la croissance, la puberté ou le vieillissement.

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

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

1.2. Produits chimiques et préparations des solutions

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

Le fipronil (lot N° B20050318, pureté 95.6 %) a été acheté chez 3B Medical Systems Inc. (Libertyville, IL, USA). Il a été administré par sondage naso-oesophagien aux animaux, dans une solution de méthyl cellulose (0.5 % p/p) et de Tween 80 (0.01 % p/v). Le fipronil a été mis en suspension par mélange énergique à l'abri de la lumière, afin d'obtenir une suspension homogène de 6 mg/mL.

1.3. Dosages

1.3.1. Dosages hormonaux

Les concentrations plasmatiques des hormones thyroïdiennes libres et totales ont été mesurées à l'aide de kits radioimmunologiques (RIA) Coat-A-Count® de Diagnostic Products Corporation (Los Angeles, Californie, USA). Tous les dosages ont été réalisés suivant les instructions des fournisseurs.

Le dosage de TSH a été réalisé en utilisant les réactifs du National Institute of Health (Bethesda, Maryland, USA).

Tous les échantillons ont été mesurés en duplicata à l'exception des échantillons des cinétiques de T₄ qui ont été dosés en simple.

Les coefficients moyens de variation intra- et inter-dosage pour les dosages hormonaux ont été inférieurs à respectivement 10 % et 15 % pour tous les dosages. La limite de quantification (LOQ) de TT₄ a été déterminée à 5 ng/mL ; celle du dosage de TSH a été validée à 0,5 ng/mL. La limite de détection des autres dosages a été fixée à celle du plus faible point de gamme soit respectivement 11 pg/mL, 0.52 pg/mL et 0.2 ng/mL pour les dosages de fT₄, fT₃ et TT₃.

1.3.2. Dosages de fipronil et de fipronil sulfone

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

L'extraction a été réalisée sur un volume de plasma de 500 μ l. Trois QC de 80, 800 et 1500 ng/mL ont été utilisés pour la validation. Le coefficient moyen de variation intra-dosage des trois QC a été inférieur à 7 % pour le fipronil et 6 % pour le fipronil sulfone, et le coefficient moyen de variation inter-dosage a été inférieur à 10 % pour le fipronil et 9 % pour le fipronil sulfone. L'exactitude a été de 84 ± 17 % pour le fipronil et le fipronil sulfone. Avec cette méthode, la LOQ est de 50 ng/mL pour le fipronil et 100 ng/mL pour le sulfone.

1.4. Analyses pharmacocinétiques

Toutes les analyses PK ont été réalisées en utilisant le logiciel WinNonlin[®] (WinNonlin[®] 5.2, Pharsight Corporation, CA, USA). L'évolution temporelle des concentrations plasmatiques des différentes substances administrées (T_4 et fipronil) a été ajustée avec la méthode des moindres carrés selon une équation polyexponentielle correspondant à un modèle pharmacocinétique.

1.4.1. Analyses pharmacocinétiques de la thyroxine

L'évolution temporelle des concentrations plasmatiques de fT_4 et de TT_4 , après l'administration intra-vasculaire de T_4 , a été calculée sur la base d'un modèle tricompartmental mamillaire, représenté par la Figure 5.

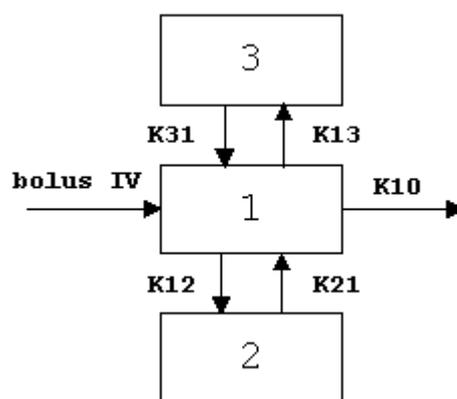


Figure 5 : Modèle compartimental de la cinétique de la T_4 , administrée par voie IV, chez le mouton

Le compartiment central, ou compartiment plasmatique, est représenté par le rectangle n°1. Toute l'élimination se fait à partir de ce compartiment. Les rectangles n°2 et n°3

représentent des compartiments périphériques, qui échangent de la thyroxine avec le compartiment plasmatique.

Dans ce type de modèle, l'équation représentant l'évolution de la concentration plasmatique au cours du temps, $C(t)$, s'écrit :

$$C(t) = Y_1 \cdot e^{-\lambda_1 \cdot t} + Y_2 \cdot e^{-\lambda_2 \cdot t} + Y_3 \cdot e^{-\lambda_3 \cdot t} \quad (\text{Equation 1})$$

Où $C(t)$ est la concentration plasmatique au temps t ; Y_i (ng/mL pour TT_4 , pg/mL pour fT_4) le coefficient de l' $i^{\text{ème}}$ terme exponentiel ; λ_i (h^{-1}) la constante de temps de l' $i^{\text{ème}}$ phase.

L'AUC a été calculée de $t=0$ à la dernière concentration détectable en utilisant la méthode des log trapèzes.

La clairance a été calculée par le rapport : $Cl = \frac{Dose}{AUC}$.

Le temps de demi-vie ($t_{1/2}$) a été défini par : $t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{\lambda_3}$.

Le volume de distribution à l'état d'équilibre (V_{ss}) est égal à $\frac{MRT}{CL}$, avec le temps moyen de résidence (MRT) égal à $\frac{AUMC}{AUC}$, où l'AUMC est l'aire sous la courbe du premier moment statistique, observée après l'administration IV de T_4 .

Les données ont été pondérées par l'inverse du carré des valeurs ajustées.

1.4.2. Analyses pharmacocinétiques du fipronil

L'évolution temporelle des concentrations plasmatiques de fipronil tout au long du traitement au fipronil, administré PO chez les moutons, a été ajustée à une équation triexponentielle, correspondant à un modèle bicompartimental avec une phase d'absorption d'ordre 1 représenté par la Figure 6.

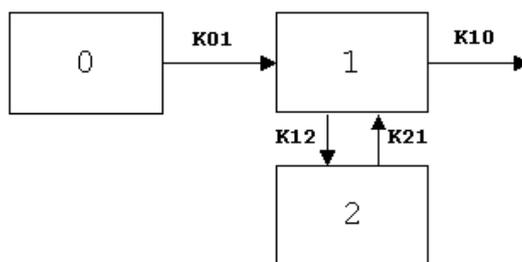


Figure 6 : Modèle compartimental de la cinétique du fipronil, administré PO, chez le mouton

Le compartiment plasmatique est représenté ici par le rectangle n°1, alors que le rectangle n°2 représente un compartiment périphérique qui échange du fipronil avec le compartiment central. La totalité de l'élimination du fipronil s'effectue à partir du compartiment central.

L'équation représentant l'évolution de la concentration plasmatique au cours du temps, $C(t)$, s'écrit alors :

$$C(t) = Y_1 \cdot e^{-\lambda_1 \cdot t} + Y_2 \cdot e^{-\lambda_2 \cdot t} + (Y_1 + Y_2) \cdot e^{-K_{01} \cdot t} \quad (\text{Equation 2})$$

Les données ont été pondérées par l'inverse du carré des valeurs observées.

Les équations sur lesquelles repose le calcul des paramètres pharmacocinétiques du fipronil sont similaires à celles décrites pour le calcul des paramètres pharmacocinétiques de la T_4 .

1.5. Analyses statistiques

L'effet du traitement au fipronil sur les concentrations moyennes sur 24 h des hormones thyroïdiennes, ainsi que sur les paramètres pharmacocinétiques moyens de fT_4 et de TT_4 , ont été analysés avec une ANOVA avec comme facteurs à effets fixes le traitement, la période (avant traitement et après une certaine durée de traitement), l'interaction traitement/période et le facteur animal niché dans le facteur traitement comme facteur à effets aléatoires. Ces analyses ont été réalisées avec le logiciel SYSTAT® (version 10, Chicago, IL, USA). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes \pm écarts types (ET).

2. Expérience 1 : Effet du fipronil sur les profils thyroïdiens de béliers à thyroïde intacte

Chez le rat le traitement par le fipronil est associé à des perturbations des profils thyroïdiens avec notamment une augmentation de la sécrétion de TSH. L'objectif de cette expérience a donc été de vérifier si de telles modifications pouvaient être reproduites chez l'ovin. Cet effet semblant plus marqué chez le mâle [2], des béliers plutôt que des brebis ont été choisis pour cette étude.

2.1. Plan expérimental

2.1.1. Animaux et administration du fipronil

2.1.1.1. Détermination de la dose de fipronil à administrer

La concentration plasmatique de fipronil à atteindre à l'état d'équilibre a été fixée à 50 ng/mL.

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

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

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

Des cinétiques de fipronil menées à l'UMR 181 chez deux brebis ayant reçu une administration IV de fipronil à 1 mg/kg ont permis, à l'aide d'un modèle tricompartimental, de déterminer la clairance du fipronil dans cette espèce à 7,6 mL/min/kg. A partir de cette valeur, la dose de fipronil à administrer pour atteindre des concentrations plasmatiques de fipronil voisines de 50 ng/mL à l'état d'équilibre a été calculée à 0,5 mg/kg par voie IV [10].

Afin de calculer la dose de fipronil à administrer par voie orale, la biodisponibilité du fipronil PO a été estimée à l'aide d'une cinétique réalisée sur deux brebis traitées PO. Elle serait d'environ 40 %.

La fréquence d'administration ayant été fixée à 4 jours, la dose de fipronil à administrer tous les 4 jours est donc égale à $\frac{\text{Dose quotidienne IV} \times 4}{\text{biodisponibilité}}$, soit 5 mg/kg.

2.1.1.2. Modalités d'administration du fipronil

L'expérience a été réalisée sur 10 béliers de poids corporel moyen de 48 ± 8 kg, répartis aléatoirement en deux groupes : un groupe témoin (n=4) et un groupe traité au fipronil (n=6). Le groupe traité a reçu 5 mg/kg de fipronil en suspension tous les 4 jours pendant un mois à l'aide d'une sonde naso-oesophagienne, le groupe témoin recevant un volume équivalent de solution témoin. Le volume administré aux animaux a été, chaque semaine, ajusté au poids corporel mesuré.

2.1.2. Prélèvements sanguins pour les profils endocriniens

Des prélèvements de sang ont été effectués toutes les 3 h pendant 24 h, à trois périodes différentes : 1 semaine avant le début de l'administration de fipronil, puis à 4 et 11 semaines de traitement. La T₃ et la T₄ (libres et totales) et la TSH ont été dosés par RIA.

Afin d'éviter toute perturbation des rythmes hormonaux, les prélèvements nocturnes de sang ont été réalisés sous lumière rouge.

2.1.3. Prélèvements sanguins pour les dosages de fipronil et fipronil sulfone

Les concentrations plasmatiques de fipronil et de fipronil sulfone ont été déterminées dans des échantillons collectés 3, 5, 7, 9, 12, 24, 48, 72 et 96 h après la première et la dernière administration de fipronil, ainsi que dans des prélèvements collectés juste avant chaque administration de fipronil.

Le traitement au fipronil a été poursuivi jusqu'à 14 semaines.

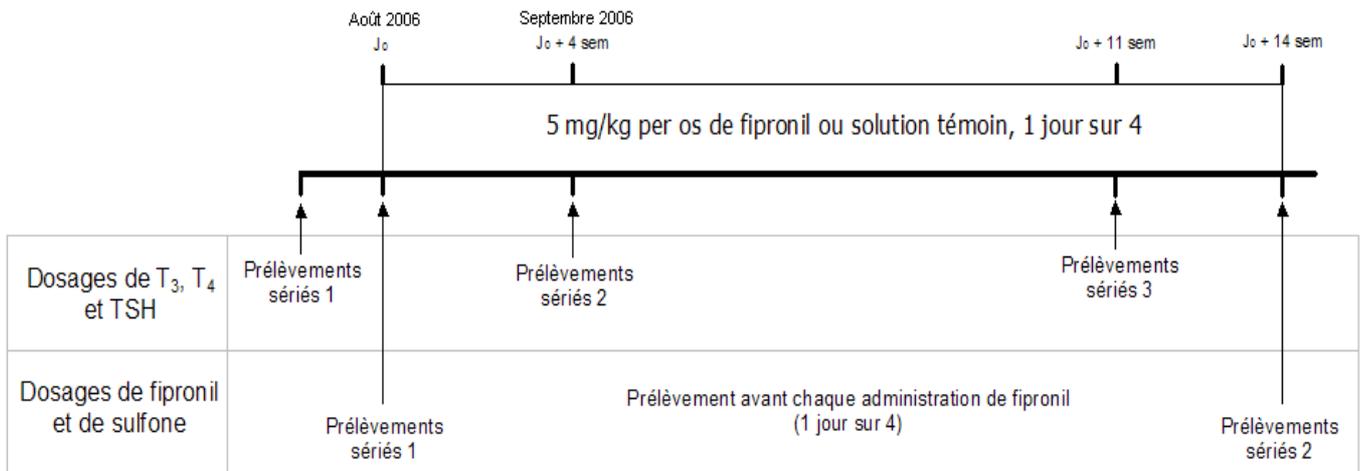


Figure 7 : Plan expérimental de l'expérience 1 (béliers THI)

Les hormones thyroïdiennes et la TSH ont été dosées par RIA. Les prélèvements sériés correspondent à un prélèvement toutes les 3 heures, pendant 24h.

Le fipronil et le fipronil sulfone ont été dosés tout au long du traitement, avant chaque administration de fipronil. Les prélèvements sériés ont été collectés à 3, 5, 7, 9, 12, 24, 48, 72 et 96 h après l'administration de fipronil.

2.2. Résultats

2.2.1. Expositions au fipronil et au fipronil sulfone

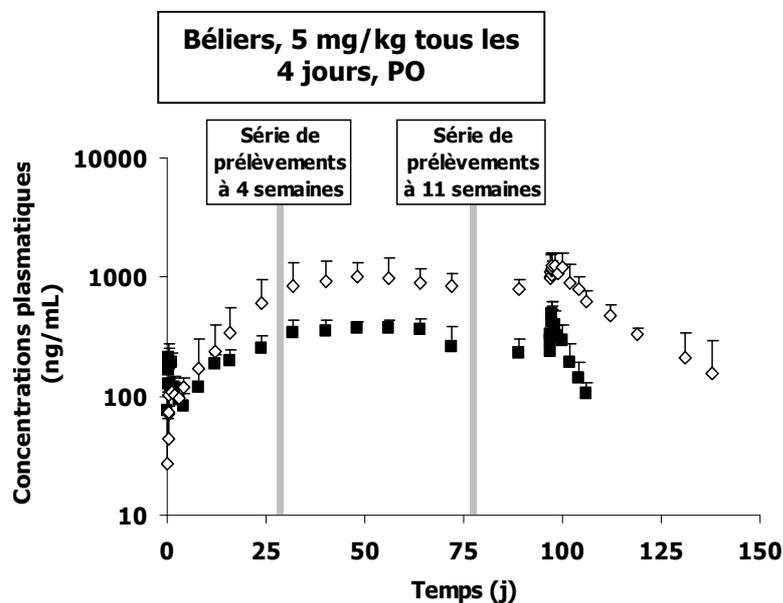


Figure 8 : Concentrations plasmatiques moyennes \pm ET de fipronil (■) et de fipronil sulfone (◇)

Les concentrations plasmatiques de fipronil (■) et de fipronil sulfone (◇) ont été suivies tout au long du traitement au fipronil chez les béliers (5 mg/kg tous les quatre jours, PO, pendant 11 semaines, n=6).

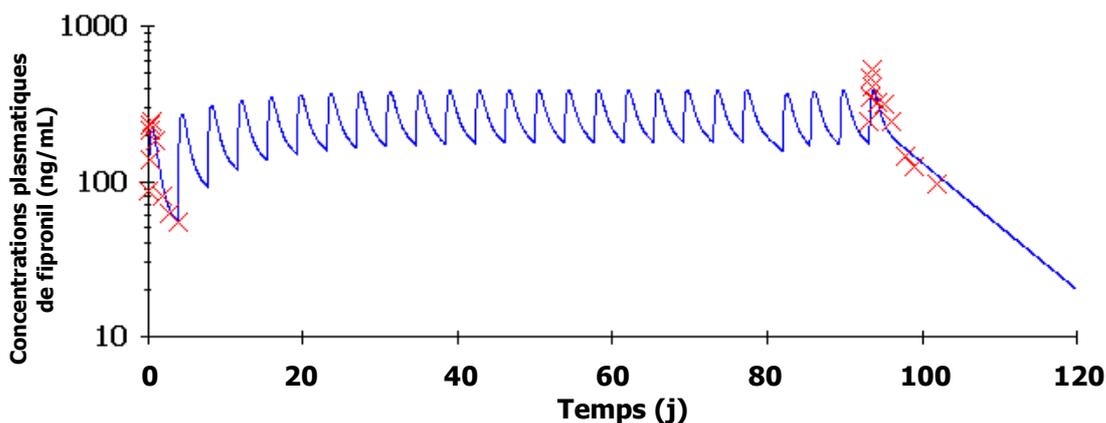


Figure 9 : Modélisation de l'exposition au fipronil chez un bélier

Evolution des concentrations plasmatiques de fipronil observées (x) et de celles ajustées (-) chez un bélier traité à 5 mg/kg tous les 4 jours, PO, pendant 90 j.

L'évolution temporelle des concentrations plasmatiques de fipronil et de fipronil sulfone est représentée dans la Figure 8. Suite à l'arrêt du traitement au fipronil, la concentration plasmatique en fipronil sulfone décroît plus lentement que celle en fipronil.

La concentration plasmatique moyenne de fipronil à l'état d'équilibre est d'environ 375 ng/mL. Les paramètres PK du fipronil, déterminés à l'aide d'un modèle bicompartimental avec une phase d'absorption d'ordre 1, sont présentés dans le Tableau 6 (page 59). Le temps de demi-vie a ainsi été calculé à 132 ± 39 h, et la clairance apparente à $3,0 \pm 0,8$ mL/min/kg. La concentration maximale (C_{\max}) est de 249 ± 49 ng/mL, à un T_{\max} de 17 ± 5 h.

La concentration plasmatique en sulfone, principal métabolite du fipronil, est rapidement supérieure à celle du fipronil. Le rapport des concentrations plasmatiques moyennes de fipronil sulfone / fipronil à l'état d'équilibre s'élève à 2,6.

2.2.2. Profils endocriniens

Les dosages des prélèvements sériés, sur 24 h, de TT_4 , TT_3 et fT_4 , ne révèlent pas de variation significatives sur 24 h des concentrations plasmatiques de ces hormones. Nous avons ainsi travaillé sur leurs concentrations plasmatiques quotidiennes moyennes.

Ces concentrations, dans le groupe témoin et dans le groupe traité au fipronil, avant l'administration de fipronil et à 4 et 11 semaines de traitement, sont représentées dans la Figure 10. Les concentrations plasmatiques de TSH sont restées inférieures à la limite de détection du dosage (0,5 ng/mL) tout au long de l'expérience.

Excepté un effet période significatif pour les concentrations plasmatiques de fT_4 , les effets traitement, période et leur interaction ne sont significatifs pour aucune des hormones thyroïdiennes.

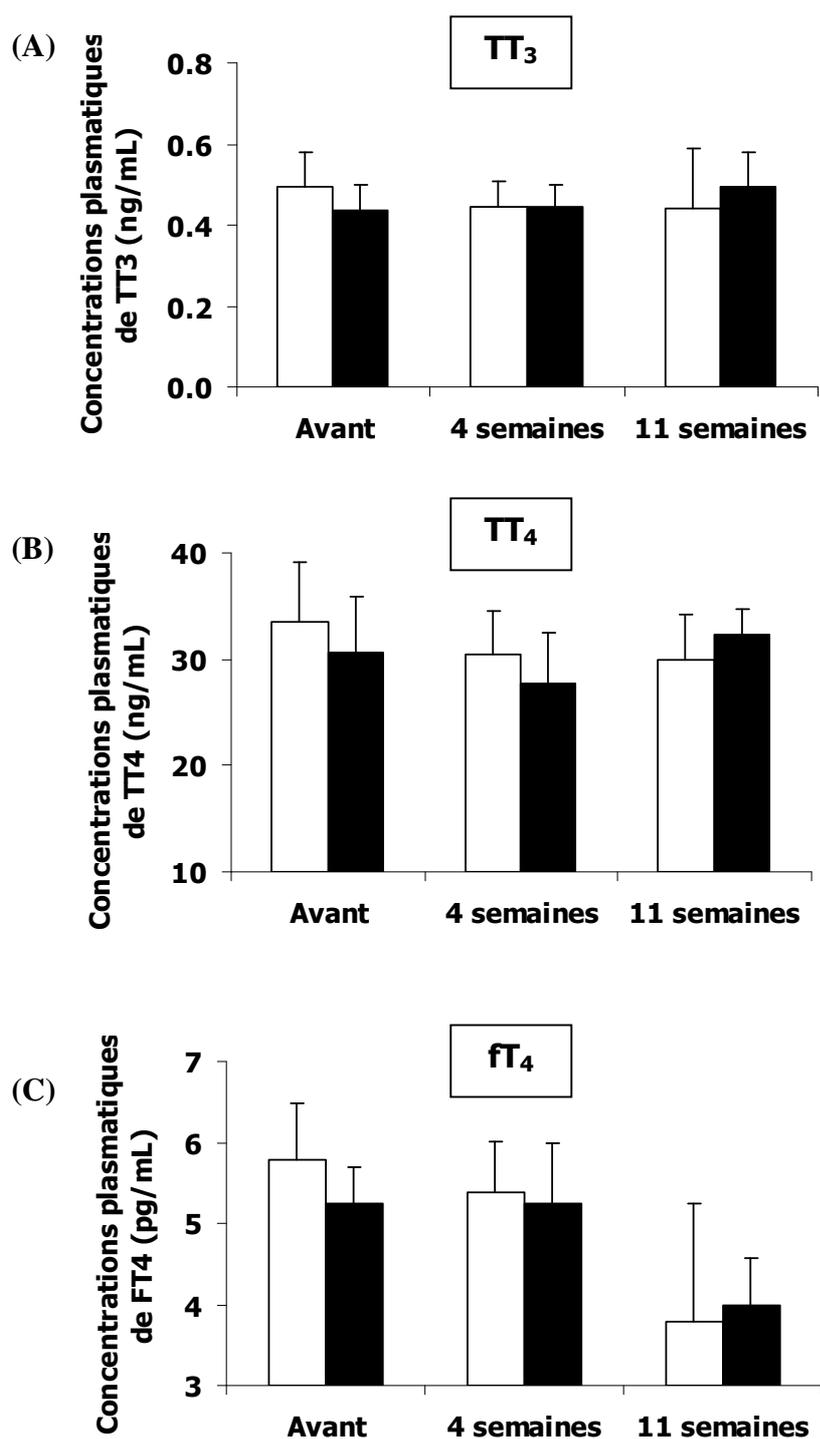


Figure 10 : Effet du traitement au fipronil sur les concentrations plasmatiques moyennes (\pm ET) sur 24 h de TT₃, TT₄ et fT₄ chez des béliers

Des groupes de 4 béliers témoins (□) et 6 béliers exposés au fipronil (■) ont été respectivement traités avec une solution témoin ou du fipronil (5 mg/kg tous les 4 jours, PO). Les concentrations plasmatiques de TT₃ (A), TT₄ (B) et fT₄ (C) ont été mesurées dans des prélèvements collectés toutes les 3 h pendant 24 h avant le début du traitement au fipronil, puis à 4 et 11 semaines de traitement.

2.3. Discussion

2.3.1. Exposition au fipronil et au fipronil sulfone

Les béliers ont un rapport des concentrations plasmatiques de fipronil sulfone/fipronil de 0.6, 24 h après la première administration. Après ingestion accidentelle de fipronil, ce rapport à 24 h post ingestion chez l'Homme était compris entre 0.25 et 0.5 [55]. Ces données suggèrent que le modèle ovin serait pertinent vis-à-vis de l'Homme non seulement en termes de régulation de la fonction thyroïdienne, mais également en termes d'exposition au fipronil et à son métabolite principal.

A l'état d'équilibre, ce rapport de concentrations s'élève à 2,6 chez les béliers. Or il a été montré, chez le rat soumis à la même exposition de 50 ng/mL de fipronil à l'état d'équilibre, que ce rapport était au minimum de 20 [47]. Le catabolisme du fipronil et sa transformation en sulfone seraient donc plus intenses chez le rat. Le fipronil sulfone, auquel le rat est plus fortement exposé que le mouton, pourrait alors être en partie responsable des effets perturbateurs thyroïdiens du fipronil clairement reconnus chez le rat.

2.3.2. Effet de l'administration de fipronil sur les profils thyroïdiens

Aucun effet du traitement au fipronil n'a été observé sur les concentrations plasmatiques moyennes sur 24 h de TT₄, fT₄ et TT₃ chez les béliers. Le fipronil, administré par voie orale à 5 mg/kg, une fois tous les 4 jours, pendant 11 semaines, ne semble donc pas modifier le profil thyroïdien des béliers. Ce résultat diffère ainsi de celui obtenu sur les rats [47].

Le fipronil pourrait ainsi ne pas avoir d'effet inducteur enzymatique, et donc ne pas affecter le métabolisme des hormones thyroïdiennes chez le mouton. Mais d'autres hypothèses peuvent expliquer cette absence d'effet apparent sur les profils thyroïdiens. En imaginant que le fipronil est réellement un inducteur enzymatique et augmente à ce titre la clairance des hormones thyroïdiennes, la concentration plasmatique de ces dernières pourrait être maintenue par des mécanismes compensateurs.

En outre, la TBG, absente chez le rat adulte, pourrait jouer un rôle protecteur face à une augmentation de clairance de la T₄ chez les ovins. La forte liaison de la T₄ à cette protéine permet en effet la formation d'un réservoir, qui pourrait être mobilisé suite à l'exposition au fipronil, et maintenir ainsi les concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes libres. Les

concentrations en TT_4 et TT_3 étant bien plus élevées que celles en hormones libres, ce déplacement d'équilibre aurait peu d'impact sur le profil thyroïdien.

Enfin, par activation de l'axe thyroïdienne, la sécrétion de T_4 par la thyroïde pourrait être augmentée. On observerait dans ce cas une augmentation des concentrations de TSH. Dans l'expérience actuelle, cette hormone restant à des seuils indétectables pour les tests utilisés, on ne peut connaître l'évolution de sa concentration, qui reste cependant de manière générale faible.

Cette étude montre clairement une absence d'effet d'un traitement au fipronil sur les profils en hormones thyroïdiennes circulantes. Cependant, il ne peut être exclu à ce niveau que le fipronil ait eu un effet sur la clairance des hormones thyroïdiennes, des mécanismes compensateurs ayant pu conduire à masquer cet effet sur le long terme. Afin de tester cette hypothèse nous avons alors étudié les effets du fipronil directement sur la clairance de la thyroxine.

3. Expérience 2 : Effet du fipronil sur la clairance des hormones thyroïdiennes dans un modèle euthyroïdien

La mesure de la clairance de la thyroxine, définie par le volume de plasma épuré de T_4 par unité de temps, nécessite de pouvoir analyser l'évolution de la concentration plasmatique en T_4 exogène au cours du temps, suite à l'apport (par injection ou ingestion) de thyroxine. Il s'agit alors de différencier la T_4 exogène de la T_4 endogène, provenant de la thyroïde. Pour cela, la méthode la plus classique consiste à utiliser un marqueur radioactif, le plus souvent avec de l'iode ^{125}I . Cette méthode permet ainsi de suivre l'évolution dans le plasma de l'iode radioactif présent dans la T_4 exogène, par mesure de la radioactivité totale des prélèvements sanguins. Cependant différentes molécules vont être produites à partir de la T_4 , telles que de la T_3 , de la rT_3 , ou de l'iode libre. Au final, ce n'est pas seulement la T_4 qui est dosée, mais également tous ses métabolites restant dans le secteur plasmatique. Pour un dosage spécifique de la T_4 exogène, il faut alors détecter la thyroxine radiomarquée par HPLC. Par ailleurs, cette méthode ne permet pas de différencier la TT_4 et la fT_4 .

Une autre méthode consiste à supprimer toute T_4 endogène, en effectuant une thyroïdectomie sur les animaux. La concentration plasmatique en T_4 est alors indétectable deux semaines après la chirurgie [80]. Cette seconde méthode introduit cependant un biais lié au statut hypothyroïdien des animaux thyroïdectomisés (THX). En effet, comme vu précédemment, l'absence de sécrétions thyroïdiennes peut avoir des répercussions sur le métabolisme des hormones thyroïdiennes, et sur le métabolisme hépatique en général. Cette méthode pourrait donc avoir un impact sur le catabolisme des hormones thyroïdiennes, et masquer l'effet du fipronil sur les enzymes hépatiques.

Afin d'éviter ce biais, il a été décidé de développer un modèle euthyroïdien, en injectant quotidiennement de la T_3 aux animaux THX. Ces animaux ($THX+T_3$) n'ont ainsi pas de T_4 endogène, sans pour autant présenter de déséquilibre thyroïdien. Le maintien de concentrations physiologiques en T_3 est en effet primordial, puisque la T_3 régule d'une part les CYP, dont le CYP 3A4 qui est un acteur crucial du métabolisme du fipronil chez l'Homme [50], et d'autre part les UDPGT, qui jouent un rôle important dans le catabolisme de la T_4 .

3.1. Matériel et méthodes

3.1.1. Modèle animal

La thyroïdectomie est pratiquée sur des animaux à jeun depuis 24 h. L'anesthésie est induite par du thiopental sodique (15 mg/kg, IV, Nesdonal[®], Merial, France), et maintenue avec 1.5 % d'isoflurane-O₂ (Aérane, Baxter SA, Maurepas, France).

La thyroïdectomie est réalisée par une voie d'abord ventrale, par incision médiale de 10 cm caudalement au larynx. La thyroïde est sectionnée au niveau de l'isthme connectif, puis chacun des deux lobes est disséqué séparément.

La couverture antibiotique est réalisée jusqu'à 3 jours après l'opération avec un antibiotique à large spectre : amoxicilline et acide clavulanique (respectivement 17 mg/kg/j et 4 mg/kg/j, Synulox[®], Pfizer, Paris, France).

En phase post-opératoire, il est important de surveiller tout signe d'état général témoignant d'une lésion nerveuse, tels que des troubles de la déglutition ou de la toux, mais aussi tout symptôme d'hypocalcémie, de type coma vitulaire.

En cas d'hypocalcémie, il est possible d'administrer 100 mL d'un soluté phosphocalcique tiédi (Bioveine gluconate de calcium) en IV lente ou par voie sous-cutanée, ou bien 150 mL d'une suspension orale concentrée en calcium et phosphore (Calform phosphore). De la vitamine D3 (Vitamine AD3E NOE) est de plus injectée par voie sous-cutanée, à raison de 0,15 millions d'UI.

3.1.2. Préparation des solutions

3.1.2.1. Solution de T₃

La solution mère, dosée à 3 mg/mL, a été préparée par dissolution dans du NaOH 0,4M-éthanol 60%. La solution à injecter, à 150 µg/mL, est obtenue en diluant la solution mère au 20^{ème} dans du sérum physiologique contenant 49,4 mg/mL de bicarbonate de sodium.

La solution obtenue, à 150 µg/mL de triiodo-L-thyronine, a été conservée à 4°C, à l'abri de la lumière.

3.1.2.2. Solution de T₄

La L-thyroxine (Throxine I-T₄) a été dissoute, pour une concentration de 4 mg/mL, dans une solution NaOH 0,4M-éthanol 60%. La solution utilisée pour les cinétiques, dosée à 200 µg/mL, a été préparée en diluant 20 fois cette solution mère dans une solution saline de pH 7,4, tamponnée par 10mM de phosphate de sodium, et contenant 0,1% de bovine serum albumine (BSA).

3.1.3. Plan expérimental

3.1.3.1. Animaux et administration du fipronil

Dix brebis, réparties aléatoirement en deux groupes de cinq brebis, ont été thyroïdectomisées, et traitées à la T₃ (1.5 µg/kg/j, SC) dès le lendemain de l'intervention chirurgicale.

Pour permettre la comparaison des effets potentiels observés sur les paramètres pharmacocinétiques des hormones thyroïdiennes dans ce modèle à ceux observés sur les bilans thyroïdiens des béliers, les mêmes modalités de traitement au fipronil que précédemment ont été appliquées. Les brebis THX+T₃ ont ainsi reçu 5 mg/kg de fipronil, administré par sonde naso-oesophagienne, tous les 4 jours pendant un mois. Le traitement au fipronil a débuté 3 semaines après la thyroïdectomie.

3.1.3.2. Prélèvements sanguins et pharmacocinétique des hormones thyroïdiennes

Afin d'évaluer les paramètres pharmacocinétiques de la thyroxine chez ces animaux THX+T₃, un apport de T₄ exogène est nécessaire, réalisé à la dose de 10 µg/kg. L'injection est réalisée par voie intraveineuse, à l'aide d'un cathéter placé dans la veine jugulaire gauche.

L'évolution des concentrations plasmatiques en fT₄ et TT₄ est alors suivie à partir de prélèvements réalisés 0, 1, 2, 4, 8, 15, 30 min et 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 24, 48, 72, 96, 120, 144 et 168 h après l'administration de T₄.

Deux cinétiques ont été réalisées : la première une semaine avant l'exposition au fipronil, la seconde après un mois de traitement. Les concentrations plasmatiques moyennes de TT₃ ont été mesurées sur les prélèvements témoins prélevés le jour des cinétiques, juste avant l'administration de T₄, pour chacune des deux périodes.

3.1.3.3. Prélèvements sanguins et dosage de fipronil

Les concentrations plasmatiques de fipronil et de fipronil sulfone ont été déterminées dans des échantillons collectés juste avant chaque administration de fipronil et 0.75, 1.25, 1.75, 2.25, 3, 4, 5 et 6 jours après la dernière administration de fipronil.

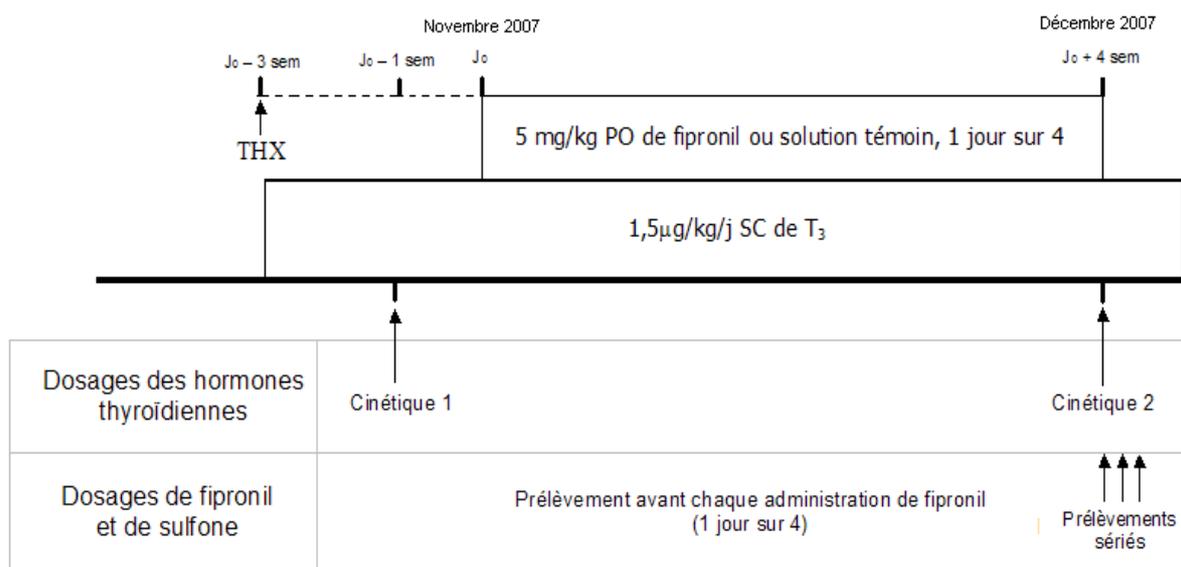


Figure 11 : Plan expérimental de l'expérience 2 (modèle THX+T₃)

La TT₃ a été dosée avant chaque cinétique. Lors des cinétiques, la TT₄ et la fT₄ ont été dosées sur des prélèvements réalisés 30 min et 0 min avant l'injection de T₄ (10 µg/kg IV), puis 1, 2, 4, 8, 15, 30 min et 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 24, 48, 72, 96, 120, 144 et 168 h après.

Le fipronil et le fipronil sulfone ont été dosés avant chaque administration de fipronil. Les prélèvements sériés ont été effectués 0.75, 1.25, 1.75, 2.25, 3, 4, 5 et 6 jours après la dernière administration de fipronil.

3.2. Résultats

3.2.1. Expositions au fipronil et au fipronil sulfone

Les moyennes des concentrations plasmatiques en fipronil et fipronil sulfone, dosées chez 5 brebis traitées au fipronil à raison de 5 mg/kg tous les 4 jours, par voie orale, sont représentées dans la figure ci dessous, en fonction du temps.

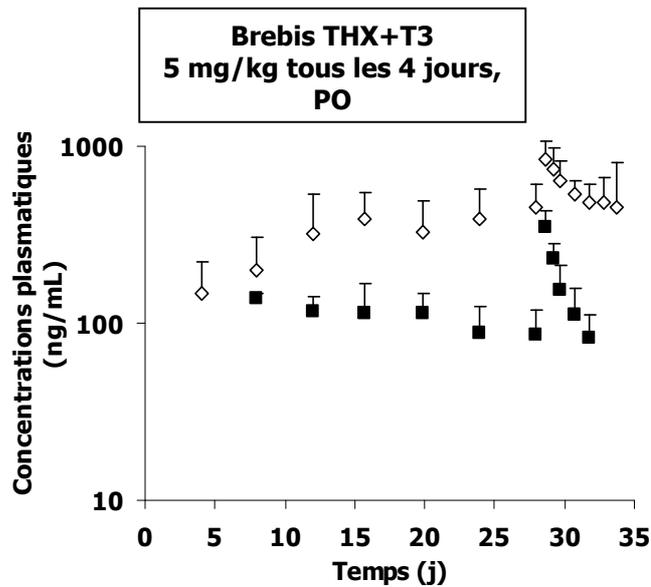


Figure 12 : Concentrations plasmatiques moyennes en fipronil (■) et fipronil sulfone (◇) ± ET

Les concentrations plasmatiques en fipronil et fipronil sulfone ont été suivies tout au long de l'administration de fipronil, chez des brebis THX+T3 recevant 5 mg/kg de fipronil tous les quatre jours, PO, pendant quatre semaines (n=5)

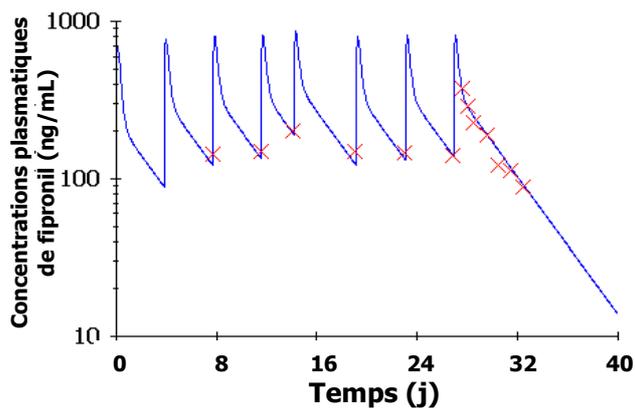


Figure 13 : Modélisation de l'exposition au fipronil une brebis THX+T₃

Evolution des concentrations plasmatiques de fipronil observées (X) et ajustées (—) chez une brebis THX+T₃ traitée à 5 mg/kg tous les quatre jours, PO, pendant 30 jours.

Comme il a été observé chez les béliers, la concentration plasmatique en fipronil sulfone décroît plus lentement à la fin du traitement que celle en fipronil.

A l'état d'équilibre, les concentrations plasmatiques moyennes de fipronil atteignent 100 ng/mL, et le rapport des concentrations plasmatiques moyennes de fipronil sulfone/fipronil s'élève à 3,3.

Sur la base d'un modèle bicompartimental avec une phase d'absorption d'ordre 1, le temps de demi-vie a été calculé à 73 ± 10 h, et la clairance apparente à $4,4 \pm 1,2$ mL/min/kg. La C_{\max} est égale à 588 ± 220 ng/mL, pour un T_{\max} de 5 ± 2 h (tableau 6).

Tableau 6 : Paramètres PK moyens de fipronil chez les béliers et les brebis THX+T₃

	Béliers THI (n=6)	Brebis THX+T₃ (n=5)
C_{max} (ng/mL)	249 ± 49	588 ± 220
T_{max} (h)	17 ± 5	5 ± 2
AUC (ng.h/mL)	28893 ± 6906	20362 ± 5633
t_{1/2} (h)	132 ± 39	73 ± 10
Cl apparente (mL/min/kg)	3,0 ± 0,8	4,4 ± 1,2

Chaque groupe a reçu 5 mg/kg de fipronil, tous les quatre jours, PO. Les paramètres PK du fipronil ont été déterminés à l'aide d'un modèle bicompartimental avec une phase d'absorption d'ordre 1.

3.2.2. Evolution des concentrations plasmatiques en T₃

Les concentrations moyennes de TT₃ avant traitement sont respectivement de 0.6 ± 0.1 et 0.7 ± 0.2 ng/mL pour le groupe témoin et le groupe traité au fipronil. Ces concentrations atteignent respectivement 1.0 ± 0.2 et 1.2 ± 0.4 ng/mL pour le groupe témoin et le groupe traité au fipronil à la fin du traitement. Si l'analyse statistique ne révèle aucun effet du traitement au fipronil sur les concentrations plasmatiques de T₃ ($p=0,67$), l'effet période est significatif ($p=0,0002$).

3.2.3. Clairance de la T₄

Les concentrations plasmatiques moyennes en fT₄ et TT₄, mesurées chez les brebis traitées à 5 mg/kg de fipronil tous les 4 jours et les brebis témoins, sont présentées dans la Figure 14. Les cinétiques ont été réalisées d'une part avant le début du traitement, d'autre part à 1 mois de traitement.

L'analyse statistique révèle un effet période significatif pour la plupart des paramètres pharmacocinétiques de TT₄ et de fT₄, à savoir l'AUC, la clairance, le temps de demi-vie et le MRT ($p \leq 0,012$), et ce chez le groupe témoin et le groupe traité au fipronil. Cela s'est notamment traduit par une diminution plus rapide des concentrations plasmatiques moyennes de TT₄ à un mois de traitement, ainsi que par une diminution de l'AUC, le MRT et le $t_{1/2}$ (Tableau 7).

Par ailleurs, une interaction traitement/période significative a été détectée pour la clairance de fT₄ ($p=0.01$), signe d'une augmentation significative de la clairance de fT₄ chez le groupe traité au fipronil.

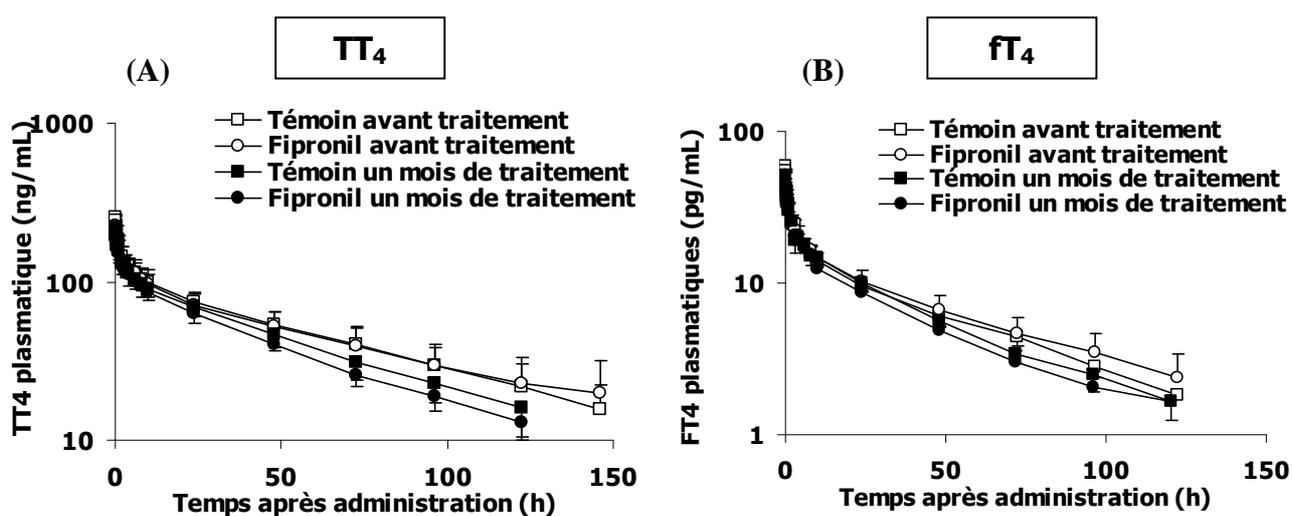


Figure 14 : Concentrations plasmatiques moyennes \pm ET en TT₄ (A) et en fT₄ (B)

Des brebis THX+T₃ (1.5 μ g/kg/j, SC) ont été traitées soit avec une solution témoin ($n=5$), soit au fipronil (5 mg/kg tous les quatre jours, PO ; $n=5$). Les concentrations plasmatiques de TT₄ (A) et de fT₄ (B) ont été déterminées dans des échantillons collectés 1, 2, 4, 8, 15, 30 min et 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 24, 48, 72, 96, 120, 144 et 168 h après une administration IV unique de T₄ (10 μ g/kg), avant le début du traitement au fipronil et un mois après.

Tableau 7 : Paramètres PK de la TT₄ et de la fT₄ chez les brebis THX+T₃, avant et un mois après l'administration de fipronil (5 mg/kg tous les 4 jours, PO) ou de solution témoin

TT ₄	Groupe témoin (n=5)		Groupe traité au fipronil (n=5)	
	Avant traitement	Après 1 mois de traitement	Avant traitement	Après 1 mois de traitement
AUC (ng.h/mL)	8460 ± 2147 ^a	6742 ± 1311 ^a	1086 ± 279 ^a	5890 ± 805 ^a
Cl (mL/min/kg)	0,021 ± 0,006 ^a	0,025 ± 0,006 ^a	0,021 ± 0,007 ^a	0,028 ± 0,005 ^a
t _{1/2} (h)	55 ± 10 ^a	46 ± 7 ^a	65 ± 23 ^a	43 ± 6 ^a
MRT (h)	76 ± 14 ^a	63 ± 10 ^a	87 ± 27 ^a	58 ± 7 ^a
Vss (L/kg)	0,091 ± 0,007	0,092 ± 0,007	0,101 ± 0,010	0,097 ± 0,009

fT ₄	Groupe témoin (n=5)		Groupe traité au fipronil (n=5)	
	Avant traitement	Après 1 mois de traitement	Avant traitement	Après 1 mois de traitement
AUC (pg.h/mL)	955 ± 129 ^a	883 ± 92 ^a	1086 ± 279 ^a	776 ± 88 ^a
Cl (mL/min/kg)	177 ± 23 ^{a, b}	185 ± 13 ^{a, b}	160 ± 33 ^{a, b}	213 ± 30 ^{a, b}
t _{1/2} (h)	44 ± 7 ^a	36 ± 3 ^a	52 ± 13 ^a	38 ± 8 ^a
MRT (h)	57 ± 9 ^a	48 ± 5 ^a	67 ± 16 ^a	47 ± 8 ^a
Vss (L/kg)	596 ± 67	533 ± 35	621 ± 90	595 ± 24

Des brebis THX traitées à la T₃ (1.5 µg/kg/j, SC) ont également été traitées avec une solution témoin (n=5) ou avec du fipronil (5 mg/kg tous les quatre jours, PO ; n=5). Les concentrations plasmatiques de TT₄ (figure 14 A) et de fT₄ (figure 14 B) ont été déterminées dans des échantillons collectés 1, 2, 4, 8, 15, 30 min et 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 24, 48, 72, 96, 120, 144 et 168 h après une administration IV unique de T₄ (10 µg/kg) avant et à un mois de traitement. Les paramètres PK de TT₄ et fT₄ ont été calculés avec un modèle tricompartmental pour chaque animal.

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

CHAPITRE III. Discussion globale

1. Effet période significatif : quel mécanisme ?

L'analyse statistique des paramètres pharmacocinétiques moyens de TT_4 et fT_4 révèle un effet significatif de la période. En effet, au cours du temps, la clairance a augmenté, et l'AUC et le temps de demi-vie ont diminué, et ce de façon similaire entre le groupe témoin et le groupe traité au fipronil.

Cette évolution au cours du temps pourrait être corrélée à l'augmentation des concentrations plasmatiques en T_3 au long de l'expérience (de 0,6 à 1,0 ng/mL pour le groupe témoin). En effet, le statut thyroïdien peut modifier le métabolisme des hormones thyroïdiennes chez le rat [93], et notamment la T_3 qui favoriserait, chez le rat, l'expression de l'UDPGT 1 [53], et ainsi le catabolisme de la thyroxine, expliquant l'augmentation de la clairance de la T_4 au cours du temps.

On peut également s'interroger sur un effet de la photopériode, la première cinétique ayant été réalisée au mois de novembre, et la seconde en décembre. D'après les données bibliographiques, la concentration plasmatique en hormones thyroïdiennes diminuerait lorsque les jours raccourcissent. Contrairement aux concentrations en T_3 qui évolueraient rapidement suite aux variations de photopériode, celles en T_4 ne seraient modifiées que quelques semaines plus tard [85], c'est à dire pendant l'hiver. Dans nos expériences, ceci n'est observable que pour la fT_4 chez les béliers, et non pour T_3 et T_4 .

Par ailleurs, l'augmentation de la photopériode aurait pour conséquence une diminution de l'expression la désiodase II chez la chèvre, ralentissant ainsi la désiodation de T_4 en T_3 [94]. L'expérience sur les brebis THX+ T_3 ayant été menée alors que la photopériode diminuait, l'expression de la désiodase II aurait alors été de plus en plus importante, ce qui est en accord avec des clairances plus élevées de T_4 après un mois d'observation.

2. Le fipronil affecte la clairance de la thyroxine, sans modifier la thyroxinémie : quel mécanisme ?

L'étude des profils thyroïdiens, chez les béliers, n'a mis en évidence aucun impact du fipronil. Cette stabilité pouvant être due à des mécanismes compensateurs visant à maintenir des concentrations circulantes en dépit d'une augmentation du catabolisme des hormones thyroïdiennes, nous avons par la suite étudié plus précisément le mécanisme primaire de la perturbation thyroïdienne mis en évidence chez le rat : l'augmentation de la clairance de la T₄. Une augmentation modérée mais significative de la clairance de la thyroxine libre a alors été observée chez le groupe exposé au fipronil, après un mois de traitement.

2.1. Hypothèse d'un mécanisme compensateur

2.1.1. Lié à l'expression de la TBG

Un rôle protecteur de la TBG a été suspecté chez l'ovin et chez l'Homme, partant du principe que la réserve de T₄ liée à la TBG pouvait compenser une élimination accrue de fT₄. Si cette hypothèse avait été vérifiée, et si le fipronil avait augmenté la clairance de la thyroxine chez le mouton, nous aurions pu nous attendre à ce que les concentrations plasmatiques de fT₄ ne soient pas modifiées grâce à l'apport du pool de T₄ liée à la TBG, contrairement à celles en TT₄ qui auraient diminuées, ce qui diffère complètement de nos résultats. L'hypothèse d'un rôle protecteur de la TBG semble alors peu probable.

2.1.2. Lié à une augmentation de synthèse

Les résultats de nos expériences révèlent un effet modéré du fipronil sur la clairance de la fT₄, sans toutefois affecter sa concentration plasmatique. L'hypothèse d'un mécanisme de compensation basé sur une augmentation de la synthèse des hormones thyroïdiennes peut alors être émise. Il semble en effet que le fipronil soit capable d'agir au niveau de la thyroïde elle-même, induisant l'augmentation de la capture d'iode et de l'activité de la TPO chez le rat [37].

2.2. Absence d'induction enzymatique chez le mouton ?

L'absence d'effet de l'exposition au fipronil sur les profils thyroïdiens pourrait s'expliquer par une absence d'induction des enzymes hépatiques responsables du catabolisme des hormones thyroïdiennes. Cette hypothèse implique une différence interspécifique quant à l'induction des enzymes hépatiques par les xénobiotiques, puisque le fipronil a clairement un effet sur le catabolisme des hormones thyroïdiennes chez le rat [47]. L'effet du fipronil sur la clairance de

l'antipyrine, et donc sa capacité à induire certaines enzymes de phase I, est d'ailleurs en accord avec une spécificité d'action. En effet, si le fipronil augmente significativement la clairance de l'antipyrine chez le rat [47], aucun impact n'a été mis en évidence sur cette clairance chez la brebis d'après une étude menée à l'UMR 181.

Le fipronil est un des nombreux ligands du "human pregnane X receptor" (hPXR) [48], récepteur inducteur de certaines enzymes dites de "détoxification", responsables du métabolisme, de la désactivation et du transport de nombreux xénobiotiques, ainsi que des hormones thyroïdiennes. L'impact du fipronil sur la clairance des hormones thyroïdiennes observé chez le rat pourrait être lié à une activation du PXR. Cependant, les importantes différences interspécifiques au niveau du domaine de liaison des récepteurs PXR impliquent qu'un xénobiotique, ligand des récepteurs CAR/PXR dans une espèce, ne l'est pas forcément dans une autre [42]. L'absence d'effet inducteur enzymatique hépatique du fipronil chez le mouton pourrait donc s'expliquer par l'absence de liaison du fipronil au récepteur PXR du mouton.

2.3. Absence d'induction enzymatique aux doses utilisées dans l'expérience?

D'après ces résultats, il n'est pas possible de conclure quant à l'effet perturbateur thyroïdien du fipronil chez le mouton, puisque son impact est très modéré (à 5 mg/kg, PO, un jour sur quatre), et n'est visible que sur la clairance de la fT_4 . Ces résultats contrastent fortement avec ceux obtenus chez le rat, espèce dans laquelle un traitement au fipronil est associé à une augmentation de 200 % de la clairance de T_4 libre et totale [47]

Le métabolisme du fipronil diffère cependant entre les ovins et les rats, ces derniers étant exposés de manière plus importante au sulfone [47]. Il est donc légitime de s'interroger sur les rôles respectifs du fipronil et de son métabolite sulfone dans les troubles de la fonction thyroïdienne observés chez le rat. Les divergences entre les deux espèces en terme de perturbation thyroïdienne pourraient donc trouver leur source dans des différences de toxicocinétiques, résultant en différentes expositions au fipronil sulfone.

3. Influence du statut physiologique sur le métabolisme du toxique

Les béliers et les brebis THX+T₃ ont reçu les mêmes doses de fipronil, par voie orale. Il s'avère cependant que les concentrations plasmatiques en fipronil et en sulfone diffèrent entre ces deux groupes.

Les concentrations plasmatiques moyennes de fipronil à l'état d'équilibre sont plus faibles pour les brebis THX+T₃ que pour les béliers, respectivement de 100 ng/mL et 375 ng/mL. Cet écart pourrait en partie être expliqué par une clairance du fipronil plus élevée chez les brebis THX+T₃ que chez les béliers, comme il est indiqué dans le Tableau 6. Par ailleurs, d'après le T_{max} des brebis THX+T₃ inférieur à celui des béliers, l'absorption du fipronil serait plus rapide chez les brebis.

Dans les deux groupes, la concentration en sulfone décroît plus lentement en fin de traitement que celle en fipronil. Cette concentration est plus élevée que celle en fipronil, avec un rapport des concentrations plasmatiques moyennes de fipronil sulfone/fipronil tendant à être plus important chez les brebis THX+T₃ (3.3 chez les brebis vs. 2.6 pour les béliers). Cette observation pourrait s'expliquer par une clairance plus lente du sulfone chez les brebis, et/ou par une production accrue de ce métabolite, qui serait liée à une différence au niveau du métabolisme hépatique.

Deux hypothèses peuvent être émises concernant cette différence apparente dans le taux de transformation métabolique du fipronil. D'une part, il pourrait exister un dimorphisme sexuel dans l'activité et l'efficacité des systèmes enzymatiques impliqués dans la transformation de l'insecticide en fipronil sulfone ; d'autre part le statut thyroïdien, n'étant pas rigoureusement identique entre les béliers et les brebis, pourrait avoir des répercussions sur l'activité des enzymes hépatiques.

3.1. Influence du sexe

Les xénobiotiques, dont le fipronil, sont majoritairement métabolisés dans le foie par les CYP. Chez le rat, les mâles présentent généralement une clairance des xénobiotiques plus élevée que les femelles, liée à une différence d'activité des CYP entre les deux sexes.

Il s'avère que l'expression des gènes codant pour une douzaine d'isoformes des CYP est régulée par les variations de la concentration plasmatique en hormone de croissance (GH). Cette hormone, sécrétée par l'hypophyse de façon pulsatile, interagirait sur l'expression de ces gènes selon la fréquence des pics de sécrétion, leur amplitude, et la concentration plasmatique en GH entre ces pics de sécrétion [92]. Ce profil, directement lié à l'action des hormones sexuelles de l'animal, présente un dimorphisme sexuel marqué, conduisant ainsi à une différence d'expression des CYP entre mâles et femelles, et ce de façon quantitative, mais aussi qualitative. Ainsi, chez le rat, les femelles expriment-elles préférentiellement les cytochromes CYP 2C12, -2C6, -2A1, alors que les cytochromes CYP 2C11, -3A2 et -2A2 sont prédominants chez les mâles [18, 61].

Parmi les CYP, la sous famille des CYP 3A de l'Homme joue un rôle particulièrement important dans le métabolisme des xénobiotiques. Il est à noter que la grossesse, la ménopause, et les cycles menstruels, peuvent interagir avec l'activité des CYP 3A [97]. Une isoforme de cette sous famille, le CYP 3A4, est majoritairement responsable du catabolisme hépatique du fipronil [83]. Or il semblerait que cet isoforme ait une activité plus élevée chez les femmes que les chez les Hommes [31], alors que ce serait l'inverse pour la plupart des autres enzymes impliquées dans le catabolisme des xénobiotiques. Cette observation, par extrapolation à l'espèce ovine, serait en accord avec nos résultats, les femelles présentant un métabolisme plus efficace du fipronil.

3.2. Influence du statut thyroïdien

Le modèle THX+T₃ a été développé pour pouvoir étudier la clairance de la thyroxine chez un animal euthyroïdien. Les concentrations plasmatiques en T₃ après 4 semaines de traitement au fipronil s'avèrent toutefois différentes entre les béliers THI et les brebis THX+T₃, respectivement d'environ 0,5 ng/mL et 1,2 ng/mL. Cette différence de statut thyroïdien, bien que minime, pourrait peut être modifier le métabolisme hépatique.

Comme évoqué précédemment, le statut thyroïdien de l'animal affecte le métabolisme des hormones thyroïdiennes elles-mêmes, par inhibition par la T_3 de la désiodase de type II [40], et l'induction de l'UDPGT 1 chez le rat [53]. De même, l'activité des systèmes enzymatiques de type cytochromes est dépendante du statut thyroïdien. Ainsi, l'expression du CYP 3A4 chez l'Homme et de différentes autres familles chez le rat serait négativement modulée par la T_3 [50]. Si une telle régulation existe chez les ovins, on pourrait s'attendre à ce que l'activité des CYP hépatiques et partant la métabolisation du fipronil, soient plus faibles chez les brebis THX+ T_3 ($[T_3]_{\text{plasma}}$ d'environ 1,2 ng/mL) que chez les béliers ($[T_3]_{\text{plasma}}$ d'environ 0,5 ng/mL). Les résultats de notre étude ne vont cependant pas dans ce sens, puisque les brebis semblent présenter un métabolisme hépatique supérieur à celui des béliers. Les différences de concentration plasmatiques de T_3 observées entre les brebis et les béliers n'expliqueraient donc pas une exposition différente au fipronil entre les deux groupes.

Conclusion

Si le fipronil ne semble présenter qu'un effet modéré sur la fonction thyroïdienne des ovins, on peut toutefois s'interroger sur les risques pour l'Homme, objectif final de notre étude.

De façon générale, les concentrations plasmatiques produites dans les études toxicologiques seraient bien supérieures à celles potentiellement retrouvées chez l'Homme, chez qui la dose maximale théorique – hors ingestion accidentelle - d'exposition au fipronil calculée suivant des scénarios maximalistes par l'AFSSA varie de 18 % de la DJA pour les adultes à plus de 900 % de la DJA pour les enfants en bas âge, soit au maximum 1.8 µg/kg de poids corporel/j [2]. Cette dose maximale reste en effet 1000 fois inférieure à celle administrée aux moutons dans les expériences décrites dans cette étude. De plus, les concentrations plasmatiques cumulées de fipronil et de fipronil sulfone chez le personnel travaillant dans les usines de production ou dans des stations de semence, population particulièrement exposée, sont majoritairement inférieures à 50 ng/mL [2], alors qu'elles sont supérieures à 500 ng/mL chez les ovins dans ces expériences.

La comparaison des travaux réalisés chez le rat aux présents travaux chez le mouton met en exergue l'existence de profondes différences quantitatives entre espèces concernant le métabolisme du fipronil. La question de la pertinence des modèles animaux pour l'évaluation du risque pour la santé humaine des perturbateurs thyroïdiens potentiels se pose donc non seulement en termes de schéma physiologique de régulation de la fonction thyroïdienne, mais également en termes de toxicocinétique et donc de métabolisme du toxique. L'étude comparative du métabolisme du fipronil par des hépatocytes des trois espèces devrait permettre d'évaluer ce dernier point.

Bibliographie

1. ABEL E., AHIMA R., BOES M., ELMQUIST J., WONDISFORD F. Critical role for thyroid hormone receptor β 2 in the regulation of paraventricular thyrotropin-releasing hormone neurons. *J. Clin. Invest.* 107 : 1017–1023, 2001.
2. AFSSA page web <http://www.actu-environnement.com/ae/news/1069.php4> (www.academie-medecine.fr/UserFiles/File/rapports-thematiques/gestion-risques/Evaluation_des_risques_pour_la_sant_humaine_li_s_une_exposition_au_fipronil.pdf)
3. BARTALENA L. Recent Achievements in Studies on Thyroid Hormone-Binding Proteins. *Endocrine reviews*, 11 (1) : 47-64, 1990.
4. BECKER K., STEPHENS K., DAVEY J., SCHNEIDER M., GALTON V. The type 2 and type 3 iodothyronine deiodinases play important roles in coordinating development in *Rana catesbeiana* tadpoles. *Endocrinology*, 138 : 2989–2997, 1997.
5. BENVENGA S., ROBBINS J. Thyroid hormone efflux from monolayer cultures of human fibroblasts and hepatocytes. Effect of lipoproteins and other thyroxine transport proteins. *Endocrinology*, 139 : 4311-4318, 1998.
6. BHAT M., CAMA H. Homeostatic regulation of free retinol-binding protein and free thyroxine pools of plasma by their plasma carrier proteins in chicken. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 587 (2, 4) : 263-272, 1979.
7. BIANCO A., SALVATORE D., GEREBEN B., BERRY M., LARSEN P. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocrine reviews*, 23(1) : 38–89, 2002.
8. BROWN-GRANT K., GIBSON J. The metabolism of exogenous and endogenous thyroid hormone in the rabbit. *J. physiol.*, 127 : 341-351, 1955.
9. CENTRE ANTI-POISON ET TOXICO VIGILANCE DE PARIS Intoxication aiguë par le fipronil. Adresse URL : www.centres-antipoison.net/stc20031124/presentations/fipronil.pdf. Page consultée le 04/06/2008.
10. COCHARD N. Pertinence du modèle ovin par rapport au modèle rat pour l'étude de la toxicité thyroïdienne du fipronil. Th.: Med. vet.: Toulouse : 4082, 60 p., 2006.
11. CURRAN P., DeGROOT L. The effect of hepatic enzyme-inducing drugs on thyroid hormones and the thyroid gland. *Endocrine reviews*, 12(2) : 135-148, 1991.
12. DAHL G., EVANS N., THRUN L., KARSCH F. A central negative feedback action of thyroid hormones on thyrotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology*, 135(6): 2392-7, 1994.
13. DAMINET S., FERGUSON D. Influence of drugs on thyroid function in dogs. *J Vet Intern Med*, 17 : 463-472, 2003.

14. DAS P., CAO Y, CHERRINGTON N, HODGSON E, ROSE R. Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions*, 164 : 200-214, 2006.
15. DAVIES A. Thyroid physiology. *Br med J.*, 2(5807) : 206–209, 1972.
16. DAVIES L., WELCH H. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973–2002. *JAMA*, 295 : 2164–2167, 2006.
17. DAVIES T., ANDO T., LIN R., TOMER Y., LATIF R. Thyrotropin receptor–associated diseases: from adenomata to Graves disease. *J Clin Invest.*, 115(8) : 1972-1983, 2005.
18. DHIR R., SHAPIRO B. Interpulse growth hormone secretion in the episodic plasma profile causes the sex reversal of cytochrome P450s in senescent male rats. *PNAS*, 100(25) : 15224–15228, 2003.
19. DOHLER K., WONG C. The rat as model for the study of drug effects on thyroid function : consideration of methodological problems. *Pharmacology and Therapeutics*, 5 : 305-318, 1979.
20. European Commission. European workshop on the impact of endocrine disrupters on human health and wildlife. Report of proceedings EUR 17549, Weybridge UK, 1996.
21. FAO/WHO. Pesticide Residues in Food-Fipronil. 1997.
22. FINDLAY K., KAPTEIN E., VISSER T., BURCHELL B. Characterization of the uridine diphosphate-glucuronosyltransferase-catalyzing thyroid hormone glucuronidation in man. *J Clin Endocrinol Metab*, 85(8) : 2879-2883, 2000.
23. FREINKEL N., LEWIS D. The effect of lowered environmental temperature on the peripheral metabolism of labelled thyroxine in the sheep. *J. Physiol.*, 135 : 288-300, 1957.
24. GAUGER K., GIERA S., SHARLIN D., BANSAL R., LANNACONE E., ZOELLER T. Polychlorinated biphenyls 105 and 118 form thyroid hormone receptor agonists after cytochrome P4501A1 activation in rat pituitary GH3 cells. *Environ Health Perspect*, 115(11) : 1623-30, 2007.
25. GAUGER K., KATO Y., HARAGUCHI K., LEHMLER H., ROBERTSON L., BANSAL R., ZOELLER R. Polychlorinated biphenyls (PCBs) exert thyroid hormone-like effects in the fetal rat brain but do not bind to thyroid hormone receptors. *Environ. Health Perspect.*, 112 : 516-23, 2004.
26. GRASBERGER H, GOLCHER H., FINGERHUT A, JANSSEN O. Loop variants of the serpin thyroxine-binding globulin: implications for hormone release upon limited proteolysis. *Biochem. J.* 365: 311-316, 2002.
27. GREENBERG A., NAJJAR S., BLIZZARD R. Effects of thyroid hormones on growth, differentiation, and development. In *Handbook of physiology*, 7(3) : 377-389, 1974.
28. HAINZL D., CASIDA J. Fipronil insecticide : novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(23) : 12764-7, 1996.

29. HAINZL D., COLE L., CASIDA J. Mechanisms for selective toxicity of fipronil insecticide and its sulfone metabolite and desulfinyl photoproduct. *Chem. Res. Toxicol.*, 11(12) : 1529-1535, 1998.
30. HARD G. Recent developments in the investigation of thyroid regulation and thyroid carcinogenesis. *Research reviews*, 106(8) : 427-437, 1998.
31. HARRIS R., BENET L., SCHWARTZ J. Gender effects in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Drugs*, 50(2) : 223-239, 1995.
32. HAYMART M., REPPLINGER D., LEVERSON G., ELSON D., SIPPEL R., JAUME J., CHEN H. Higher serum thyroid stimulating hormone level in thyroid nodule patients is associated with greater risks of differentiated thyroid cancer and advanced tumor stage. *J. Clin Endocrinol Metab*, 93(3) : 809–814, 2008.
33. HEUER H., VISSER T. Pathophysiological importance of thyroid hormone transporters. *Endocrinology*, 2008.
34. HOCH F. Metabolic effects of thyroid hormones In *Handbook of physiology*, 7(3) : 391-411, 1974.
35. HOOD A. ALLEN M.L., LIU Y., LIU J., KLAASSEN C. Induction of T₄ UDP-GT activity, serum thyroid stimulating hormone, and thyroid follicular cell proliferation in mice treated with microsomal enzyme inducers. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 188(1) : 6-13, 2003.
36. HOOD A., LIU Y., GATTONE V., KLAASSEN C. Sensitivity of thyroid gland growth to thyroid stimulating hormone (TSH) in rats treated with antithyroid drugs. *Toxicol Sci*, 49(2) : 263-71, 1999.
37. HURLEY P., HILL R., WHITING R. Mode of carcinogenic action of pesticides inducing thyroid follicular cell tumors in rodents. *Environ. Hlth. Perspect.*, 106, 8, 437-445, 1998.
38. INSTITUT NATIONAL DE VEILLE SANITAIRE. Fiche de commentaire "thyroïde" des estimations nationales d'incidence et de mortalité en France de 1980 à 2005. Adresse URL : http://www.invs.sante.fr/surveillance/cancers/estimations_cancers/donnees_localisation/thyroide/comment_thyroide.pdf. Page consultée le 24/04/2009.
39. JENTSCH T, STEIN V., WEINREICH F., ZDEBIK A. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev.*82:503–68, 2002.
40. KIM S., HARNEY J., LARSEN P. Studies of the hormonal regulation of type 2 5'-iodothyronine deiodinase messenger ribonucleic acid in pituitary tumor cells using semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *Endocrinology*, 139(12) : 4895–4905, 1998.
41. KITAMURA S., JINNO N., SUZUKI T., SUGIHARA K., OHTA S., KUROKI H., FUJIMOTO N. Thyroid hormone-like and estrogenic activity of hydroxylated PCBs in cell culture. *Toxicology*, 208(3) : 377-387, 2005.

42. KRETSCHMER X., BALDWIN W. CAR and PXR: xenosensors of endocrine disrupters? *Chem Biol Interact*, 155(3): 111-128, 2005.
43. LANS M., SPIERTZ C., BROUWER A., KOEMAN J. Different competition of thyroxine binding to transthyretin and thyroxine-binding globulin by hydroxy-PCBs, PCDDs and PCDFs. *Eur J Pharmacol*, 270(2-3) : 129-136, 1994.
44. LARSEN P. Salicylate-induced increases in free triiodothyronine in human serum : Evidence of inhibition of triiodothyronine binding to thyroxine-binding globulin and thyroxine-binding prealbumin. *J. Clin. Invest.* 51: 1125-1134, 1972.
45. LARSON S., JACKSON L., RIAL T., UCHIDA T., THOMAS R., QIU S., EVERS M. Increased incidence of well-differentiated thyroid cancer associated with hashimoto's thyroiditis and the role of the PI3k/akt pathway. *J Am Coll Surg.*, 204(5) : 764-775, 2007.
46. LARSSON M., PETTERSON T., CARLSTROM A. Thyroid hormone binding in serum of 15 vertebrate species : isolation of thyroxine-binding globulin and prealbumin analogs. *General and comparative endocrinology*, 58, 360-375, 1985.
47. LEGHAIT J., GAYRARD V., PICARD-HAGEN N., CAMP M., PERDU E., TOUTAIN P., VIGUIE C. Fipronil-induced disruption of thyroid function in rats is mediated by increased total and free thyroxine clearances concomitantly to increased activity of hepatic enzymes. *Toxicology*, 255(1-2) : 38-44, 2009.
48. LEMAIRE G., MNIF W., PASCUSI J. Identification of new human pregnane X receptor ligands among pesticides using a stable receptor cell system. *Toxicol Sci.* 2006; 91(2): 501-9.
49. LI P., AKK G. The insecticide fipronil and its metabolite fipronil sulfone inhibit the rat $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$ GABA_A receptor. *Bri J pharmacol*, 155 : 783-794, 2008.
50. LIDDLE C., GOODWIN B., GEORGE J., TAPNER M., FARREL G. Separate and interactive regulation of cytochrome P450 3A4 by triiodothyronine, dexamethasone, and growth hormone in cultured hepatocytes. *J Clin Endocrinol Metab*, 83(7) : 2411-6. 1998.
51. MAIA A., KIM B., HUANG S., HARNEY J., LARSEN P. Type 2 iodothyronine deiodinase is the major source of plasma T3 in euthyroid humans. *J. Clin. Invest.*, 115(9) : 2524-2533, 2005.
52. MARSHALL J., PENSKY J., GREEN A. Studies on human thyroxine-binding globulin : VI. The nature of slow thyroxine-binding globulin. *J Clin Invest.*, 51(12) : 3173-3181, 1972.
53. MASMOUDI T., HIHI A., VAZQUEZ M., ARTUR Y., DESVERGNE B., WAHLI W., GOUDONNET H. Transcriptional regulation by triiodothyronine of the UDP-glucuronosyltransferase family 1 gene complex in rat liver. Comparison with induction by 3-methylcholanthrene. *J Biol Chem*, 272(27) : 17171-5, 1997.
54. Mc CLAIN R. Mechanistic considerations for the relevance of animal data on thyroid neoplasia to human risk assessment. *Mutation Res.* 333, 131-142, 1995.

55. MOHAMED F., SENARATHNA L., PERCY A., ABEYEWARDENE M., EAGLESHAM G. Acute Human Self-Poisoning with the *N*-Phenylpyrazole Insecticide Fipronil –A GABAA-Gated Chloride Channel Blocker. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 42(7): 955–963, 2004.
56. MORENO M., LANNI A., LOMBARDI A., GOGLIA F. How the thyroid controls metabolism in the rat: different roles for triiodothyronine and diiodothyronines. *Journal of Physiology*, 505(2) : 529-538, 1997.
57. MORSE D., GROEN D, VEERMAN M, VAN AMERONGEN C, KOETER H, SMITS VAN PROOIJJE A, VISSER T, KOEMAN J, BROUWER A. Interference of polychlorinated biphenyls in hepatic and brain thyroid hormone metabolism in fetal and neonatal rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 122(1) : 27-33, 1993.
58. NARAHASHI T, ZHAO X, IKEDA T, NAGATA K, YEH J. Differential actions of insecticides on target sites: basis for selective toxicity. *Hum Exp Toxicol.*, 26(4):361-6, 2007.
59. NISHIMURA N., YONEMOTO J., MIYABARA Y., SATO M., TOHYAMA C. Rat thyroid hyperplasia induced by gestational and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Endocrinology*, 144(5) : 2075-83, 2003.
60. O'CONNOR J., FRAME S., LADICS G. Evaluation of a 15-day screening assay using intact male rats for identifying antiandrogens. *Toxicol Sci*, 69(1): 92-108, 2002.
61. OINONEN T., LINDROS K. Zonation of hepatic cytochrome P-450 expression and regulation. *Biochem J*, 329(1) : 17-35, 1998.
62. OPPENHEIMER J., SCHWARTZ H., SHAPIRO H., BERNSTEIN G., SURKS M. Differences in primary cellular factors influencing the metabolism and distribution of 3,5,3'-l-triiodothyronine and l-thyroxine. *J. Clin Invest.*, 49 : 1016-1024, 1970.
63. PADRIDGE W.M., MIETUS L. Influx of thyroid hormones into rat liver in vivo : differential availability of thyroxine and triiodothyronine bound by plasma proteins. *J Clin Invest.*, 66(2) : 367-374, 1980.
64. PAPAVALIIOU S., MARTIAL J., LATHMAN K., BAXTER J. Thyroid hormonelike actions of 3,3',5'-L-Triiodothyronine and 3,3'-Diiodothyronine. *J. Clin Invest.*, 60(6): 1230–1239, 1977.
65. POCAR P., KLONISCH T., BRANDSCH C., EDER K., FROLICH C. HOANG-VU C. HOMBACH-KLONISCH S. AhR-agonist-induced transcriptional changes of genes involved in thyroid function in primary porcine thyrocytes. *Toxicol Sci*, 89(2) : 408-14, 2006.
66. POP V. Low maternal free thyroxine concentrations during early pregnancy are associated with impaired psychomotor development in infancy. *Clin Endocrinol* , 50(2) : 149-55. 1999.
67. RAOUF A., GEISOW M., O'GORMAN P., MARSDEN P. HOWORTH P. A method for the preparation of human thyroxine-binding globulin ; its importance in the establishment of an accurate and specific radioimmunoassay. *Clin. Chim. Acta*, 104(1) : 25-41, 1980.

68. RATRA G, CASIDA J. GABA receptor subunit composition relative to insecticide potency and selectivity. *Toxicol Lett.* 122 (3) : 215-22, 2001.
69. RATRA G, KAMITA S, CASIDA J. Role of the human GABA_A receptor β 3 subunit in insecticide toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 172:233–40, 2001.
70. REFETOFF S. Thyroid hormone serum transport protein : structure, properties, genes and transcriptional regulation. [En ligne], Chapitre 3a. Adresse URL : <http://www.thyroidmanager.org/Chapter3/3a/chapter3a.pdf>. Page consultée le 23/06/2008.
71. REFETOFF S., FANG V., MARSHALL J. Studies on human thyroxine-binding globulin : IX. Some physical, chemical, and biological properties of radioiodinated TBG and partially desialylated TBG. *J Clin Invest.*, 56(12) : 177–187, 1975.
72. REFETOFF S., FANG V., MARSHALL J., ROBIN N. Metabolism of thyroxine-binding globulin in man. Abnormal rate of synthesis in inherited thyroxine-binding globulin deficiency and excess. *J Clin Invest.*, 57(2): 485–495, 1976.
73. REFETOFF S., ROBIN N., FANG V. Parameters of thyroid function in serum of 16 selected vertebrates species : a study of PBI, serum T4, free T4, and the pattern of T4 and T3 binding to serum proteins. *Endocrinology*, 86 : 793-805, 1970.
74. ROUAZE-ROMET M., VRANCKX R., SAVU L., NUNEZ E. Structural and functional microheterogeneity of rat thyroxine-binding globulin during ontogenesis. *Biochemical J.*, 286(1) : 125-130, 1992.
75. SALVATORE D., BARTHA T., HARNEY J., LARSEN P. Molecular biological and biochemical characterization of the human type 2 selenodeiodinase. *Endocrinology*, 137 : 3308–3315, 1996.
76. SCHEIDEN R., KEIPES M., BOCK C., DIPPELL W., KIEFFER N., CAPESIUS C. Thyroid cancer in Luxembourg : a national population-based data report (1983–1999). *BMC Cancer*, 6 : 102, 2006.
77. SCHUSSLER G. The thyroxine-binding proteins. *Thyroid*, 10(2) : 141-149, 2000.
78. SEWALL C., FLAGER N., VANDENHEUVEL J., CLARK G., TRISCHER A., MARONPOT R., LUCIER G. Alterations in thyroid function in female sprague-dawley rats following chronic treatment with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 132(2) : 237-244, 1995.
79. SMAILYTE G., MISEIKYTE-KAUBRIENE E., KURTINAITIS J. Increasing thyroid cancer incidence in Lithuania in 1978–2003. *BMC Cancer*, 6:284, 2006.
80. SUTHERLAND R., SIMPSON-MORGAN M. Effect of thyroidectomy on the concentration of plasma thyroxine-binding proteins in sheep. *J. Endocr.*, 60 : 191-192, 1974.
81. SUTHERLAND R., SIMPSON-MORGAN, M. The thyroxine-binding of serum proteins. A competitive binding technique employing sephadex G-25. *J. Endocr.*, 65 : 319-332, 1975.

82. SZEGEDI V, BÁRDOS G, DÉTÁRI L, TÓTH A, BANCZEROWSKI-PELYHE I, VILÁGI I. Transient alterations in neuronal and behavioral activity following bensultap and fipronil treatment in rats. *Toxicology*, 15;214(1-2):67-76, 2005.
83. TANG, J., USMANI, A., HODGSON, E., ROSE, RL. In vitro metabolism of fipronil by human and rat cytochrome P450 and its interactions with testosterone and diazepam. *Chemico-Biological Interactions*, 147 : 319-329, 2004.
84. TINGLE C., ROTHER J., DEWHURST C., LAUER S., KING W.. Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. *Rev Environ Contam Toxicol.*, 176 : 1-66, 2003.
85. TODINI L. Thyroid hormones in small ruminants : effect of endogenous, environmental and nutritional factors. *Animal*, 17 : 997-1008, 2007.
86. TONG W. Actions of thyroid-stimulating hormone In *Handbook of physiology*, 7(3) : 255-283, 1974.
87. VAN DEN BERG K., VAN RAAIJ J., BRAGT P. Interactions of halogenated industrial chemicals with transthyretin and effects on thyroid hormone levels in vivo. *Arch Toxicology*, 65(1) : 15-19, 1991.
88. VAN SANDE J., MASSART C., BEAUWEN R. Anion selectivity by the sodium iodide symporter. *Endocrinology*, 144 : 247-52, 2003.
89. VISSER T., KAPTEIN E., Van TOOR H., Van RAAIJ J., Van den BERG K., JOE C., Van ENGELEN J., BROUWER A. Glucuronidation of thyroid hormone in rat liver : effects of in vitro treatment with microsomal enzyme inducers and in vitro assay conditions. *Endocrinology*, 133(5) : 2177-2186, 1993.
90. VRANCKZ R., ROUAZE M., NUNEZ E., BEAUMONT C., FLINK I. The hepatic biosynthesis of rat thyroxine binding globulin (TBG) : demonstration, ontogenesis, and up-regulation in experimental hypothyroidism. *Biochemical and biophysical research communications*, 167(1) : 317-322, 1990.
91. WANG L., LEHMLER H., ROBERTSON L., JAMES M. Polychlorobiphenyls are selective inhibitors of human phenol sulfotransferase 1A1 with 4-nitrophenol as a substrate. *Chemico-Biological Interactions*, 15(3): 235-246, 2006.
92. WAXMAN D., PAMPORI N., RAM P., AGRAWAL A., SHAPIRO B. Interpulse interval in circulating growth hormone patterns regulates sexually dimorphic expression of hepatic cytochrome P450. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88 : 6868-6872, 1991.
93. YAMADA H., DISTEFANO J., YEN Y., NGUYEN T. Steady-state regulation of whole-body thyroid hormone pool sizes and interconversion rates in hypothyroid and moderately T3-stimulated rats. *Endocrinology*, 137(12): 5624-33, 1996.
94. YASUO S., NAKAO N., OHKURA S., LIGO M.,HAGIWARA S., GOTO A., ANDO H., YAMAMURA T. *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*, 147(1) : 432-440, 2006.

95. ZHAO X., YEH J., SALGADO V., NARAHASHI T. Sulfone metabolite of fipronil blocks γ -aminobutyric acid- and glutamate-activated chloride channels in mammalian and insect neurons. *J pharmacol exp ther*, 314 : 363-373, 2005.
96. ZHOU A, WEI Z., READ R.J., CARRELL R. Structural mechanism for the carriage and release of thyroxine in the blood. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 103(36) : 13321–13326, 2006.
97. ZHU B., LIU Z. CHEN G., CHEN X., OU-YANG D., WANG L., HUANG L. The distribution and gender difference of CYP3A activity in Chinese subjects. *Br J Clin Pharmacol*, 55 : 264–269, 2003.
98. ZOELLER R.T., BANSAL R, PARRIS C. Bisphenol-A, an environmental contaminant that acts as a thyroid hormone receptor antagonist *in vitro*, increases serum thyroxine and alters RC3/neurogranin expression in the developing rat brain. *Endocrinology*, 146(2) : 607-612, 2005.

Toulouse, 2009

NOM : PELISSIE

Prénom : Elodie

TITRE : LE FIPRONIL, AGENT DE PERTURBATION THYROÏDIENNE ? EXPOSITION ET REEVALUATION DE SA TOXICITE THYROÏDIENNE DANS L'ESPECE OVINE, MODELE POUR LA REGULATION THYROÏDIENNE DE L'HOMME

RESUME : Si le fipronil est reconnu comme perturbateur thyroïdien et inducteur de tumeurs de la thyroïde chez le rat, sa toxicité thyroïdienne envers l'Homme reste inconnue. Ce travail consiste à étudier l'impact du fipronil dans l'espèce ovine, sur des animaux de statut euthyroïdien, ce qui nécessite l'élaboration d'un modèle physiologique pour le suivi des concentrations des hormones endogènes. Les profils thyroïdiens ne semblent pas affectés par l'exposition au fipronil, alors que la clairance de la thyroxine libre est modérément mais significativement augmentée après un mois de traitement. L'extrapolation à l'Homme reste cependant délicate, du fait de la différence potentielle de toxicocinétique entre les différentes espèces.

MOTS-CLES : FIPRONIL / PERTURBATEUR ENDOCRINIEN / FONCTION THYROIDIENNE / THYROXINE-BINDING GLOBULIN / THYROXINE / OVINE.

ENGLISH TITLE : FIPRONIL, AGENT FOR THYROID DISRUPTION ? EXPOSURE AND REASSESSMENT OF ITS THYROID TOXICITY IN SHEEP, MODEL FOR REGULATION OF HUMAN THYROID

ABSTRACT : If fipronil is recognized as a thyroid disruptor and inducing thyroid tumors in rats, thyroid toxicity toward humans remains unknown. The aim of this work is to study the impact of fipronil in sheep, on euthyroid status animals, which requires developing a physiological model for monitoring concentrations of endogenous hormones. The thyroid profiles appear unaffected by exposure to fipronil, whereas the clearance of free thyroxine is moderately but significantly increased after one month of treatment. Extrapolation to human remains delicate because of the potential difference in toxicokinetics between species.

KEYWORDS : FIPRONIL / ENDOCRINE DISRUPTER / THYROID FUNCTION / THYROXINE-BINDING GLOBULIN / THYROXINE / OVINE.