

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS	p 15
LISTE DES ABREVIATIONS	p 19
INTRODUCTION	p 21
PARTIE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	p 23
1- LA FONCTION THYROÏDIENNE	p 23
1.1- L'AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSO-THYROÏDIEN	p 23
1.1.1- La glande thyroïde	p 23
1.1.2- Les hormones thyroïdiennes	p 24
1.1.3- La synthèse des hormones thyroïdiennes	p 24
1.1.3.1- Capture des iodures plasmatiques	p 24
1.1.3.2- Iodation des résidus tyrosyls de la thyroglobuline	p 25
1.1.3.3- Libération des hormones	p 25
1.1.4- Rôle et mécanisme d'action des hormones thyroïdiennes	p 26
1.1.4.1- Rôle des hormones thyroïdiennes	p 26
1.1.4.2- Mécanisme d'action des hormones thyroïdiennes	p 27
1.1.5- Le métabolisme et l'élimination des hormones thyroïdiennes	p 27
1.1.6- Régulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien	p 28
1.2- LE TRANSPORT PLASMATIQUE DES HORMONES THYROÏDIENNES	p 29
1.2.1- Les protéines de transport des hormones thyroïdiennes	p 29
1.2.1.1- La TBG	p 30
1.2.1.2- La TTR	p 31
1.2.1.3- L'albumine	p 31
1.2.2- Les variations interspécifiques	p 32
2- ETUDE DES PERTURBATEURS DE LA FONCTION THYROÏDIENNE	p 34
2.1- LES PRINCIPALES MOLECULES QUI PERTURBENT LA FONCTION THYROÏDIENNE	p 34
2.1.1- Les PCBs : Biphényles polychlorés	p 34
2.1.2- Les dioxines	p 35
2.1.3- Les retardateurs de flamme	p 36
2.1.4- Les phénols : nonylphenol (NP), pentachlorophenol (PCP) et bisphénol A (BPA)	p 37
2.1.5- Les phtalates	p 37
2.1.6- Les parabènes	p 38
2.1.7- Les pesticides	p 38
2.2- LES MECANISMES D'ACTION DES MOLECULES PERTURBANT LA FONCTION THYROÏDIENNE	p 39
2.2.1- La synthèse des hormones thyroïdiennes : interférence avec le NIS, le TPO et les récepteurs de la TSH	p 39
2.2.2- Les protéines de transport	p 40
2.2.3- Les mécanismes de capture cellulaire	p 40
2.2.4- Le récepteur aux hormones thyroïdiennes	p 40
2.2.5- La croissance neuronale	p 41
2.2.6- Métabolisme et circulation des hormones thyroïdiennes	p 41

2.3- LES CONSEQUENCES SUR L'ORGANISME DES PERTURBATIONS THYROÏDIENNES.....	p 42
2.3.1- Apparition de troubles fonctionnels.....	p 42
2.3.2- Carcinogénèse thyroïdienne.....	p 42
3- LE FIPRONIL.....	p 43
3.1- STRUCTURE.....	p 43
3.2- MODE D'ACTION.....	p 44
3.3- METABOLISME.....	p 44
3.4- FIPRONIL ET FONCTION THYROÏDIENNE.....	p 46
PARTIE 2 : REALISATIONS EXPERIMENTALES.....	p 49
1- INTRODUCTION A LA PARTIE EXPERIMENTALE.....	p 49
2- MATERIEL ET METHODES COMMUNS AUX TROIS EXPERIENCES.....	p 51
2.1- ANIMAUX.....	p 51
2.2- PREPARATION DES SOLUTIONS.....	p 51
2.2.1- Préparation de la suspension de fipronil.....	p 51
2.2.2- Préparation de la solution de T3.....	p 51
2.2.3- Préparation de la solution de T4.....	p 52
2.3- THYROÏDECTOMIE ET MISE EN PLACE DES CATHETERS.....	p 53
2.3.1- Thyroïdectomies.....	p 53
2.3.2- Mise en place des cathéters.....	p 54
2.4- MODALITES DE TRAITEMENT DES ECHANTILLONS DE SANG.....	p 54
2.5- MODALITES D'ANALYSE DES ECHANTILLONS.....	p 55
3- EXPERIENCE 1 : EFFET DU FIPRONIL SUR LES CONCENTRATIONS EN HORMONES THYROÏDIENNES ET EN TSH CHEZ LE RAT FEMELLE.....	p 56
3.1- OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	p 56
3.2- MATERIEL ET METHODES.....	p 56
3.2.1- Animaux.....	p 56
3.2.2- Méthodologie expérimentale.....	p 56
3.2.2.1- Plan expérimental (Figure 7).....	p 56
3.2.2.2- Modalités de traitement des animaux au fipronil.....	p 57
3.2.2.3- Modalités de collecte des échantillons.....	p 57
3.2.2.4- Modalités de traitement des échantillons.....	p 58
3.2.3- Analyses statistiques.....	p 58
3.3- RESULTATS.....	p 58
3.3.1- Suivi du poids des rats.....	p 58
3.3.2- Concentrations plasmatiques en T3 totale.....	p 60
3.3.3- Concentrations plasmatiques en T4 totale.....	p 61
3.3.4- Concentrations plasmatiques en T4 libre.....	p 62
3.3.5- Concentrations plasmatiques en TSH.....	p 63
3.3.6- Concentrations plasmatiques en fipronil et en fipronil sulfone.....	p 65
4- EXPERIENCE 2 : EFFET DU FIPRONIL SUR LA CLAIRANCE DE LA T4 CHEZ LE RAT FEMELLE THYROÏDECTOMISE SUPPLEMENTE EN T3.....	p 66
4.1- OBJECTIF DE L'ETUDE.....	p 66
4.2- MATERIEL ET METHODES.....	p 66
4.2.1- Animaux.....	p 66
4.2.2- Méthodologie expérimentale.....	p 67

4.2.2.1- Plan expérimental (Figure 14).....	p 67
4.2.2.2- Modalités de traitement des animaux au fipronil.....	p 67
4.2.2.3- Modalités de traitement des animaux à la T3.....	p 68
4.2.2.4- Cinétique de T4.....	p 68
4.2.2.5- Analyse des données.....	p 69
4.3- RESULTATS.....	p 70
4.3.1- Suivi du poids des rats.....	p 70
4.3.2- Clairance de T4 totale.....	p 70
4.3.3- Clairance de T4 libre.....	p 73
5- ESSAI PILOTE : EFFET DU FIPRONIL ET D'UNE SUPPLEMENTATION EN T3 SUR LA CLAIRANCE DE LA T4 CHEZ LE RAT FEMELLE THYROÏDECTOMISE.....	p 77
5.1- OBJECTIF DE L'ESSAI.....	p 77
5.2- MATERIEL ET METHODES.....	p 77
5.2.1- Animaux.....	p 77
5.2.2- Méthodologie expérimentale.....	p 77
5.2.2.1- Plan expérimental (Figure 19).....	p 77
5.2.2.2- Modalités de traitement des animaux au fipronil.....	p 78
5.2.2.3- Modalités de traitement des animaux à la T3.....	p 78
5.2.2.4- Evolution du protocole au cours de l'étude.....	p 79
5.2.2.5- Cinétique de T4.....	p 79
5.3- RESULTATS.....	p 79
5.3.1- Suivi du poids des rats.....	p 79
5.3.2- Clairance de la T4 totale.....	p 81
TROISIEME PARTIE : DISCUSSION.....	p 87
CONCLUSION.....	p 91
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	p 93

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Les hormones thyroïdiennes iodées.....	p 24
Figure 2 : La cellule folliculaire thyroïdienne.....	p 26
Figure 3 : Axe Hypothalamo-Hypophyso-Thyroïdien de régulation de la sécrétion des hormones thyroïdiennes.....	p 29
Figure 4 : Structure chimique du fipronil.....	p 43
Figure 5 : Photodégradation du fipronil dans l'environnement.....	p 45
Figure 6 : Les voies du métabolisme du fipronil chez le rat.....	p 46
Figure 7 : Plan expérimental de l'expérience 1.....	p 57
Figure 8 : Evolution des poids corporels moyens (\pm ET) des rats des lots contrôles et des lots traités pendant 14 jours. A partir de J0, les animaux ont reçu quotidiennement par VO une administration de fipronil (3 mg/kg/j) ou du milieu de suspension pendant une période de 14 jours, les pesées ont été bi-hebdomadaires.....	p 59
Figure 9 : Evolution des poids corporels moyens (\pm ET) des rats des lots contrôles et des lots traités pendant 28 jours. A partir de J0, les animaux ont reçu quotidiennement par VO une administration de fipronil (3 mg/kg/j) ou du milieu de suspension pendant une période de 28 jours, les pesées ont été bi-hebdomadaires.....	p 60
Figure 10 : Concentrations plasmatiques moyennes en T3 totale (\pm ET). Les concentrations plasmatiques en TT3 ont été évaluées chez des rats contrôles et chez des rats traités quotidiennement au fipronil par VO (3 mg/kg/j) pendant une période de 14 jours ou de 28 jours.....	p 61
Figure 11 : Concentrations plasmatiques moyennes en T4 totale (\pm ET). Les concentrations plasmatiques en TT4 ont été évaluées chez des rats contrôles et chez des rats traités quotidiennement au fipronil par VO (3 mg/kg/j) pendant une période de 14 jours ou de 28 jours.....	p 62
Figure 12 : Concentrations plasmatiques moyennes en T4 libre (\pm ET). Les concentrations plasmatiques en fT4 ont été évaluées chez des rats contrôles et chez des rats traités quotidiennement au fipronil par VO (3 mg/kg/j) pendant une période de 14 jours.....	p 63
Figure 13 : Concentrations plasmatiques moyennes en TSH (\pm ET). Les concentrations plasmatiques en TSH ont été évaluées chez des rats contrôles et chez des rats traités quotidiennement au fipronil par voie orale (3 mg/kg/j) pendant une période de 14 ou de 28 jours.....	p 64
Figure 14 : Plan expérimental de l'expérience 2.....	p 67

Figure 15 : Effet du fipronil sur l'évolution temporelle des concentrations plasmatiques moyennes en TT4 (\pm ET) après une administration de T4 par voie IP chez des rats thyroïdectomisés et supplémentés en T3. Les rats thyroïdectomisés traités quotidiennement par voie SC avec de la T3 (12 μ g/kg/j) ont reçu une administration quotidienne par VO de fipronil (3 mg/kg/j) (lot traité au fipronil) ou de milieu de suspension (lot contrôle) pendant une période de 14 jours. Le jour suivant la dernière administration, les concentrations en T4 totale ont été suivies après une administration unique de T4 par voie IP (10 μ g/kg).....p 71

Figure 16 : Effet du fipronil sur la clairance moyenne de TT4 (\pm ET) après une administration de T4 par voie IP chez des rats thyroïdectomisés et supplémentés en T3. Les rats thyroïdectomisés traités quotidiennement par voie SC avec de la T3 (12 μ g/kg/j) ont reçu une administration quotidienne par VO de fipronil (3 mg/kg/j) (lot traité au fipronil) ou de milieu de suspension (lot contrôle) pendant une période de 14 jours. Le jour suivant la dernière administration, les concentrations en T4 totale ont été suivies après une administration unique de T4 par voie IP (10 μ g/kg).....p 72

Figure 17 : Effet du fipronil sur l'évolution temporelle des concentrations plasmatiques moyennes en fT4 (\pm ET) après une administration de T4 par voie IP chez des rats thyroïdectomisés et supplémentés en T3. Les rats thyroïdectomisés traités quotidiennement par voie SC avec de la T3 (12 μ g/kg/j) ont reçu une administration quotidienne par VO de fipronil (3 mg/kg/j) (lot traité au fipronil) ou de milieu de suspension (lot contrôle) pendant une période de 14 jours. Le jour suivant la dernière administration, les concentrations en T4 libre ont été suivies après une administration unique de T4 par voie IP (10 μ g/kg).....p 74

Figure 18 : Effet du fipronil sur la clairance moyenne de fT4 (\pm ET) après une administration de T4 par voie IP chez des rats thyroïdectomisés et supplémentés en T3. Les rats thyroïdectomisés traités quotidiennement par voie SC avec de la T3 (12 μ g/kg/j) ont reçu une administration quotidienne par VO de fipronil (3 mg/kg/j) (lot traité au fipronil) ou de milieu de suspension (lot contrôle) pendant une période de 14 jours. Le jour suivant la dernière administration, les concentrations en T4 libre ont été suivies après une administration unique de T4 par voie IP (10 μ g/kg).....p 75

Figure 19 : Plan expérimental de l'essai pilote.....p 78

Figure 20 : Evolution des poids corporels moyens (\pm ET) des rats des lots contrôles. Les rats thyroïdectomisés ont reçu quotidiennement par voie SC une administration de T3 (12 μ g/kg/j de J2 à J40 puis 6 μ g/kg/j de J41 à J56) (lot TBG⁻) ou de solvant (lot TBG⁺) et une administration quotidienne par VO de milieu de suspension pendant une période de 14 jours, les pesées ont été bi-hebdomadaires.....p 80

Figure 21 : Evolution des poids corporels moyens (\pm ET) des rats des lots traités. Les rats thyroïdectomisés ont reçu quotidiennement par voie SC une administration de T3 (12 μ g/kg/j de J2 à J40 puis 6 μ g/kg/j de J41 à J56) (lot TBG⁻) ou de solvant (lot TBG⁺) et une administration quotidienne par VO de fipronil (10 mg/kg/j de J37 à J40 puis 1.5 mg/kg/j de J41 à J56) pendant une période de 14 jours, les pesées ont été bi-hebdomadaires.....p 81

Figure 22 : Cinétique de décroissance des concentrations plasmatiques moyennes en TT4 chez des rats des lots (TBG⁻) et (TBG⁺) contrôles après une administration de T4 par voie IV. Les rats thyroïdectomisés ont reçu quotidiennement par voie SC une administration de T3 (12 µg/kg/j de J2 à J40 puis 6 µg/kg/j de J41 à J56) (lot TBG⁻) ou de solvant (lot TBG⁺). Ils ont reçu une administration quotidienne de milieu de suspension par VO pendant une période de 14 jours. Le jour suivant la dernière administration, les concentrations en T4 totale ont été suivies après une administration unique de T4 par voie IV (12 µg/kg)..... p 82

Figure 23 : Cinétique de décroissance des concentrations plasmatiques moyennes en TT4 chez des rats des lots (TBG⁻) et (TBG⁺) traités au fipronil après une administration de T4 par voie IV. Les rats thyroïdectomisés ont reçu quotidiennement par voie SC une administration de T3 (12 µg/kg/j de J2 à J40 puis 6 µg/kg/j de J41 à J56) (lot TBG⁻) ou de solvant (lot TBG⁺). Ils ont reçu une administration quotidienne de fipronil par VO (10 mg/kg/j de J37 à J40 puis 1.5 mg/kg/j de J41 à J56) pendant une période de 14 jours. Le jour suivant la dernière administration, les concentrations en T4 totale ont été suivies après une administration unique de T4 par voie IV (12 µg/kg)..... p 83

Figure 24 : Effet du fipronil sur la clairance de la TT4 chez les rats thyroïdectomisés (lots TBG⁺) et les rats thyroïdectomisés traités à la T3 (lots TBG⁻) après l'administration par voie IV de T4. Les rats ont reçu quotidiennement par voie SC une administration de T3 (12 µg/kg/j de J2 à J40 puis 6 µg/kg/j de J41 à J56) (lots TBG⁻) ou de solvant (lot TBG⁺). Ils ont reçu une administration quotidienne de fipronil par VO (10 mg/kg/j de J37 à J40 puis 1.5 mg/kg/j de J41 à J56) ou de milieu de suspension pendant une période de 14 jours. Le jour suivant la dernière administration, les concentrations en T4 totale ont été suivies après une administration unique de T4 par voie IV (12 µg/kg)..... p 84

Tableau 1 : Caractéristiques des protéines de transport des hormones thyroïdiennes iodées [50]. *B_{max}* est la concentration en site de liaison de la protéine de transport. Elle représente la capacité maximale de liaison. *K_d* est la concentration en hormones thyroïdiennes libres permettant de saturer la moitié des sites de liaison de la protéine de transport..... p 32

Tableau 2 : Paramètres de la fonction thyroïdienne chez l'homme, les ovins et le rat..... p 33

Tableau 3 : Effet du fipronil sur les concentrations en TT3, TT4, fT4 et TSH chez le rat. Les rats ont reçu quotidiennement par VO une administration de fipronil (3 mg/kg/j) ou du milieu de suspension, pendant une période de 14 jours ou de 28 jours..... p 64

Tableau 4 : Concentrations plasmatiques en fipronil et en fipronil sulfone. Les rats ont reçu quotidiennement par VO une administration de fipronil (3 mg/kg/j), pendant une période de 28 jours..... p 65

Tableau 5 : Effet du fipronil sur les paramètres pharmacocinétiques moyens de la TT4 (\pm ET) après une injection IP de T4 chez des rats thyroïdectomisés et supplémentés en T3. Les rats thyroïdectomisés traités quotidiennement par voie SC avec de la T3 (12 μ g/kg/j) ont reçu une administration quotidienne par VO de fipronil (3 mg/kg/j) (lot traité au fipronil) ou de milieu de suspension (lot contrôle) pendant une période de 14 jours. Le jour suivant la dernière administration, les concentrations en T4 totale ont été suivies après une administration unique de T4 par voie IP (10 μ g/kg). Les paramètres pharmacocinétiques sont calculés avec un modèle non compartimental pour chaque animal.....p 73

Tableau 6 : Effet du fipronil sur les paramètres pharmacocinétiques moyens de la fT4 (\pm ET) après une injection IP de T4 chez des rats thyroïdectomisés et supplémentés en T3. Les rats thyroïdectomisés traités quotidiennement par voie SC avec de la T3 (12 μ g/kg/j) ont reçu une administration quotidienne par VO de fipronil (3 mg/kg/j) (lot traité au fipronil) ou de milieu de suspension (lot contrôle) pendant une période de 14 jours. Le jour suivant la dernière administration, les concentrations en T4 libre ont été suivies après une administration unique de T4 par voie IP (10 μ g/kg). Les paramètres pharmacocinétiques sont calculés avec un modèle non compartimental pour chaque animal.....p 76

Tableau 7 : Effet du fipronil sur les paramètres pharmacocinétiques de la TT4 chez les rats thyroïdectomisés (lots TBG⁺) et les rats thyroïdectomisés traités à la T3 (lots TBG⁻) après une administration unique de T4 par voie IV chez le rat. Les rats thyroïdectomisés ont reçu quotidiennement par voie SC une administration de T3 (12 μ g/kg/j de J2 à J40 puis 6 μ g/kg/j de J41 à J56) (lots TBG⁻) ou de solvant (lot TBG⁺). Ils ont reçu une administration quotidienne par VO de fipronil (10 mg/kg/j de J37 à J40 puis 1.5 mg/kg/j de J41 à J56) ou de milieu de suspension pendant une période de 14 jours. Le jour suivant la dernière administration, les concentrations en T4 totale ont été suivies après une injection unique de T4 (12 μ g/kg) par voie IV. Les paramètres pharmacocinétiques ont été calculés avec un modèle non compartimental pour chaque animal.....p 85

LISTE DES ABREVIATIONS

- Afssa : Agence française de sécurité sanitaire des aliments
- Afsse : Agence française de sécurité sanitaire environnementale
- AUC : Area Under the Curve
- BBP : Butyl-benzyl-phthalate
- BPA : Bisphenol A
- BSA : Bovine Serum Albumine
- BW : Body Weight
- C_{max} : Concentration plasmatique maximale
- CYP : Cytochrome P450
- DDT : Dichloro-diphényl-trichloro-éthane
- DEHP : Di(2-éthylhexyl) phtalates
- DIDP : Di-iso-décyl phtalate
- DIT : Diiodothyrosine
- DnHP : Di-n-hexyl phtalate
- DnOP : Di-n-octyl phtalate
- EDSTAC : Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee
- EPA : Environmental Protection Agency
- ET : Ecart-type
- fT3 : Free triiodothyronine
- fT4 : Free thyroxine
- GABA : Acide γ -amino-butérique
- HCB : Hexachlorobenzène
- HPLC : High Performance Liquid Chromatography
- IP : Intrapéritonéal
- IV : Intraveineux
- K_m : Constante d'affinité
- LD_{50} : Dose létale 50
- LOQ : Limit Of Quantification
- MBC : 4-méthylbenzylène-camphor
- MIT : Monoiodothyrosine
- MRT : Temps moyen de résidence
- NIS : Symport sodium-iodé

- NP : Nonylphenol
- OPC : Oligodendrocyte Precursor Cell
- PBDEs : Polybrominated diphenyl ethers
- PCBs : Polychlorinated biphenyls
- PCDDs : Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins
- PCDFs : Polychlorinated dibenzo-*p*-furans
- PCP : Pentachlorophenol
- RIA : Radio Immunologic Assay
- SC : Sous-cutané
- $t_{1/2}$: Temps de demi-vie
- T3 : Triiodothyronine
- T4 : Thyroxine
- TBBPA : Tetrabromobisphenol A
- TBG : Thyroxin-Binding Globuline
- TBPA : Thyroxin-Binding Prealbumine
- TCDD : 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxin
- Tmax : Temps d'occurrence de la concentration maximale
- TPO : Thyroperoxydase.
- TRE : Thyroid Hormone Responsive Element
- TRH : Thyroid-Releasing Hormone
- TSH : Thyroid-Stimulating Hormone
- TT3 : Total triiodothyronine
- TT4 : Total thyroxine
- TTR : Transthyrétine
- UDPGT : Uridinediphosphate-glucuronosyl-transferase.
- UGT : Uridine-Glucuronosyltransférases
- V_D : Volume de distribution
- V_{max} : vitesse d'élimination maximale
- VO : Voie orale.
- V_{ss} : Volume de distribution à l'équilibre

INTRODUCTION

Le fipronil est une substance active de produit phytosanitaire, ou pesticide, qui appartient à la famille chimique des phénylpyrazoles. Cette molécule est utilisée dans le domaine agricole pour son effet insecticide. Elle est utilisée notamment comme principe actif de l'insecticide *Régent*® commercialisé par BASF (USA).

Du fait de l'industrialisation croissante, de nombreux produits chimiques se retrouvent dans l'environnement et s'y accumulent. Les effets de ces produits chimiques sont encore mal connus, mais ils sont suspectés de pouvoir altérer les fonctions endocriniennes chez l'homme. Les ministres en charge de l'agriculture, de la santé, de la consommation et de l'environnement ont conjointement saisi l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) et l'Agence française de sécurité sanitaire environnementale (Afsse) afin d'examiner les incertitudes scientifiques sur le risque pour la santé humaine pouvant résulter des expositions au fipronil [1]. Le fipronil peut se retrouver facilement dans l'environnement et du fait de sa stabilité, il est considéré comme un polluant environnemental.

Le fipronil est également considéré comme un perturbateur endocrinien. Un perturbateur endocrinien, ou modulateur endocrinien, est défini comme "un agent exogène qui interfère avec la production, la libération, le transport, le métabolisme, la liaison, l'action et l'élimination des hormones naturelles responsables du maintien de l'homéostasie et de la régulation des processus de développement" [25].

Des études montrent que l'incidence des cancers de la thyroïde chez l'homme est en augmentation sans pouvoir trouver d'étiologie à ces cancers [22]. Parmi les étiologies possibles, des facteurs environnementaux ont été incriminés, comme certains pesticides. Selon une étude réalisée chez le rat [19], le fipronil est décrit comme étant un agent inducteur de la carcinogenèse thyroïdienne chez cette espèce. Le schéma physiopathologique proposé est que le fipronil induirait des tumeurs de la thyroïde par un déséquilibre hormonal caractérisé par une hypersécrétion prolongée de TSH (Thyroid-Stimulating Hormone), libérée par l'hypophyse, en réponse à une diminution des concentrations des hormones thyroïdiennes circulantes. Ce schéma physiopathologique hypothétique n'a pas été démontré.

La question est de savoir s'il est possible d'extrapoler à l'homme les résultats obtenus chez le rat concernant la toxicité du fipronil sur la fonction thyroïdienne, en raison des variations

interspécifiques de cette fonction. En effet, chez l'homme, le temps de demi-vie de la thyroxine (T4) est de plusieurs jours, alors que chez le rat, il n'est que de quelques heures [12]. Cette nette différence est attribuée au fait que le rat ne possède pas de TBG (Thyroxin-Binding Globuline), protéine spécifique de transport des hormones thyroïdiennes, qui lie 75% de la thyroxine plasmatique chez l'homme [46].

Cette thèse s'inscrit dans le programme de recherche sur l'étude de l'impact du fipronil sur la fonction thyroïdienne, étude réalisée par l'UMR 181 Physiopathologie et Toxicologie Expérimentales INRA/ENVT, en collaboration avec de nombreuses équipes. L'objectif de ce travail de thèse est de valider le schéma physiopathologique du fipronil sur la fonction thyroïdienne chez le rat à travers l'évaluation de l'effet du fipronil sur les concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes et en TSH et sur la clairance des hormones thyroïdiennes.

La partie bibliographique consistera dans un premier temps en un rappel sur la fonction thyroïdienne à travers la synthèse des hormones thyroïdiennes, leur rôle, leur métabolisme, la régulation de leur synthèse et leur transport. Dans un second temps, elle fera la synthèse des données concernant les perturbateurs de la fonction thyroïdienne et le fipronil.

La partie expérimentale présentera les études qui ont été mises en œuvre pour répondre à nos objectifs. Dans un premier temps, nous étudierons l'effet du fipronil sur les concentrations en hormones thyroïdiennes chez le rat femelle. Dans un deuxième temps, nous évaluerons l'effet du fipronil sur la clairance de la T4 chez le rat femelle de manière à valider le schéma physiopathologique hypothétique du fipronil sur la fonction thyroïdienne dans cette espèce. Enfin, nous présenterons les résultats d'un essai pilote qui avait pour objectif d'examiner le rôle de la TBG sur l'effet perturbateur thyroïdien du fipronil chez le rat.

PARTIE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1- LA FONCTION THYROÏDIENNE

1.1- L'AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSO-THYROÏDIEN

1.1.1- La glande thyroïde

La thyroïde est une glande exclusivement endocrine qui sécrète principalement les hormones thyroïdiennes iodées, impliquées notamment dans la régulation du métabolisme basal, et la calcitonine, encore appelée hormone anti-hypercalcémiant.

En Allemagne, la thyroïde est appelée "glande bouclier" en référence à sa forme, la thyroïde est aussi dite en forme de papillon. Elle est fixée par des tissus fibreux sur la face antérieure et sur la face latérale du larynx et de la trachée. Sa surface antérieure est convexe et sa surface postérieure est concave. La glande thyroïde est constituée de deux lobes reliés par l'isthme de la thyroïde qui se situe juste sous le cartilage cricoïde du larynx. La thyroïde est enveloppée par une fine capsule fibreuse.

De chaque côté de la thyroïde se situent les quatre glandes parathyroïdes qui permettent la régulation de l'homéostasie phosphocalcique. Les nerfs laryngés récurrents courent le long de chaque lobe thyroïdien et sont l'objet de toutes les attentions du chirurgien lors de chirurgie de la thyroïde.

D'un point de vue histologique, la thyroïde est composée d'une capsule et d'un parenchyme glandulaire. L'unité fonctionnelle de la glande thyroïde est la vésicule thyroïdienne. C'est une petite sphérule de taille variable formée d'une monocouche de cellules entourant une lumière emplie d'un constituant appelé colloïde dont la majeure partie est formée par la thyroglobuline. Les cellules vésiculaires thyroïdiennes, ou thyrocytes, sécrètent les iodothyronines. Elles ont une forme cuboïde plus ou moins aplatie selon l'état d'activité de la glande. Contre ces cellules principales, des cellules parafolliculaires, ou cellules C, synthétisent la calcitonine.

Les glandes thyroïdes reçoivent une irrigation sanguine à très fort débit par des artères issues de la carotide externe, essentiellement par une artère thyroïdienne crâniale qui se ramifie et forme un réseau de capillaires à la surface des vésicules. Ces capillaires sont drainés par les

veines thyroïdiennes qui rejoignent la veine jugulaire. Un réseau lymphatique entoure également les vésicules thyroïdiennes.

1.1.2- Les hormones thyroïdiennes

Les hormones thyroïdiennes iodées sont des hormones apolaires synthétisées à partir d'iode et de résidus tyrosine de la thyroglobuline. Elles sont au nombre de deux : la T4 ou thyroxine ou L-tétraiodothyronine et la T3 ou L-triiodothyronine (Figure 1).

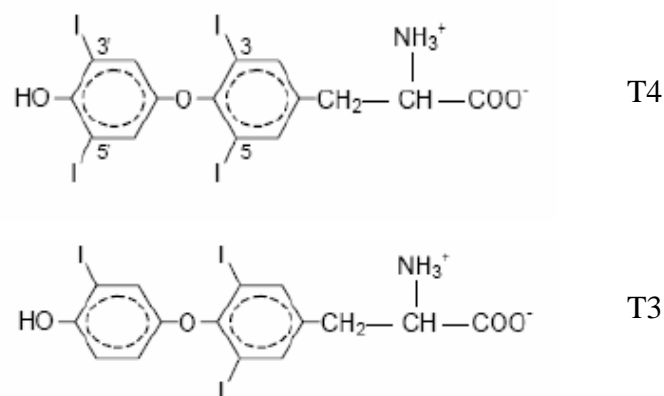


Figure 1 : Les hormones thyroïdiennes iodées.

La thyroïde sécrète principalement la T4, mais la forme biologiquement active est la T3. La conversion de la T4 en T3 se fait dans de nombreux organes grâce à la thyroxine-5'-désiodase qui est une enzyme réalisant la 5'-monodésiodation de la T4. La T4 est ainsi considérée comme "la forme circulante" des hormones thyroïdiennes iodées et la T3 "la forme biologiquement active".

1.1.3- La synthèse des hormones thyroïdiennes

1.1.3.1- Capture des iodures plasmatiques

Les ions iodures sont des composants indispensables dans la synthèse des hormones thyroïdiennes iodées. En effet les iodures représentent 65% de la masse de T4 et 58% de celle de T3 [3].

La capture des iodures plasmatiques est un processus très actif fonctionnant contre un fort gradient de concentration. Cette mise en réserve des iodures est essentielle pour assurer une synthèse continue des hormones car les apports en iodures sont exclusivement alimentaires et peuvent varier notablement d'une période à une autre. La capture des iodures du secteur extracellulaire par les cellules folliculaires implique un système de cotransport Na^+/I^- de la membrane basolatérale utilisant le gradient de Na^+ produit par une pompe Na^+/K^+ -ATPase de la même membrane. L'activité de ce transporteur est accrue lors de stimulation par la TSH (Thyroid-Stimulating Hormone).

Il semble que la capture des iodures représente l'étape limitante de la synthèse des hormones thyroïdiennes iodées (Figure 2).

1.1.3.2- Iodation des résidus tyrosyls de la thyroglobuline

L'iodation des résidus tyrosyls de la thyroglobuline intervient dans la lumière folliculaire par des réactions de substitution. Celles-ci se déroulent au contact entre la membrane apicale et la colloïde. L'iodation des résidus tyrosyls est un processus complexe qui nécessite la thyroglobuline, des iodures, la thyroperoxydase, de l'eau oxygénée H_2O_2 et du NADPH.

La thyroperoxydase est une enzyme glycoprotéique de la membrane apicale permettant d'oxyder les iodures en ion iodonium I^+ et de substituer les résidus tyrosyls de la thyroglobuline en MIT (monoiodothyrosine) et DIT (diiodothyrosine). Ensuite, la thyroglobuline couple deux résidus iodotyrosyls voisins pour former la T4 principalement et la T3. Les iodothyroglobulines apparaissent ainsi comme des réserves d'hormones.

1.1.3.3- Libération des hormones

La thyroglobuline doit pénétrer dans les cellules folliculaires pour que les hormones soient libérées. Ce processus se déroule par micropinocytose à partir de la membrane apicale des thyrocytes.

Les gouttelettes de colloïde fusionnent alors avec des lysosomes primaires au voisinage du pôle apical. Dans les vésicules, l'hydrolyse progressive de la thyroglobuline au fur et à mesure que l'acidification progresse libère les hormones T4 et T3 ainsi que des résidus MIT et DIT non couplés. Dans les cellules vésiculaires, les MIT et DIT sont recyclés par désiodation, libérant des iodures qui seront de nouveau utilisés pour ioder la thyroglobuline. Les hormones thyroïdiennes iodées, T4 et T3, sont libérées dans le torrent circulatoire par exocytose [26].

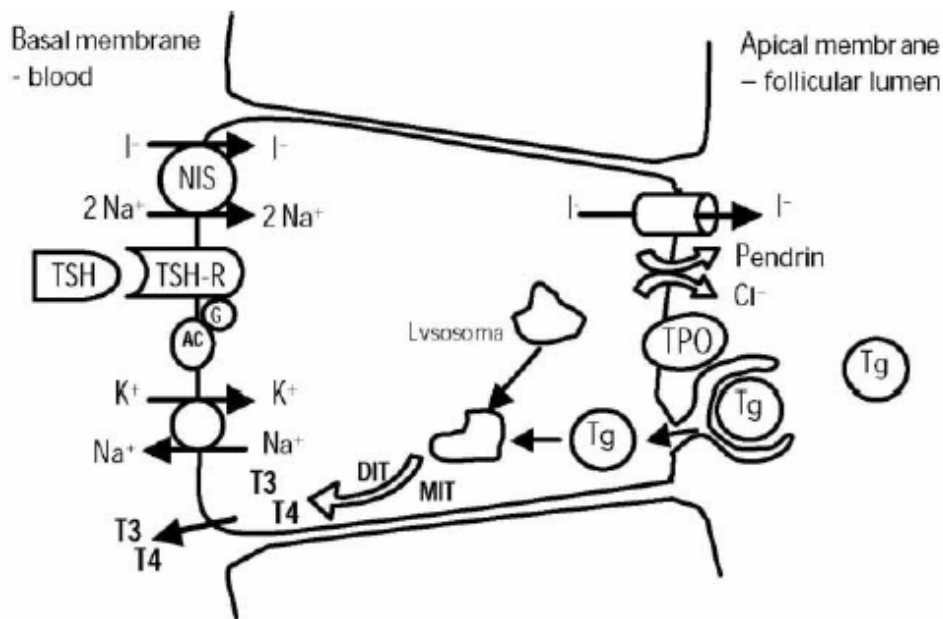


Figure 2 : La cellule folliculaire thyroïdienne. [4] AC : adénylate cyclase, DIT : diiodothyrosine, G : G-protéine, MIT : monoiodothyrosine, NIS : symport sodium-iode, Tg : thyroglobuline, TPO : thyroperoxydase, TSH : Thyroid-Stimulating Hormone, TSH-R : récepteur à la TSH.

1.1.4- Rôle et mécanisme d'action des hormones thyroïdiennes

1.1.4.1- Rôle des hormones thyroïdiennes

Une fois dans la circulation sanguine, la majeure partie des hormones thyroïdiennes est liée à des protéines de transport. Les formes libres et liées sont en équilibre. Seules les formes libres peuvent être captées par les cellules cibles. A la surface des cellules cibles et des cellules hépatiques, des enzymes membranaires vont capter la T4. Elle va être désiodée par la thyroxine-5'-désiodase en T3, forme biologiquement active [24].

Le rôle essentiel des hormones thyroïdiennes est de favoriser la calorigénèse, pour l'essentiel en augmentant la consommation d'oxygène et la synthèse d'ATP dans de nombreux organes, dont le foie et les muscles. Cet effet dose-dépendant est observé pour des concentrations physiologiques [8].

En dehors de ses actions métaboliques, les hormones thyroïdiennes sont indispensables au développement et à la croissance, à la fertilité et à la reproduction. Elles sont particulièrement importantes dans le développement du système nerveux, et le déficit en hormones thyroïdiennes conduit à de très sévères retards mentaux chez l'homme. En effet, dans les

régions naturellement pauvres en iode, la déficience en hormones thyroïdiennes du fœtus est responsable de l'apparition de retard mental mieux connu sous le nom de "crétinisme". Durant l'enfance, un manque en hormones thyroïdiennes provoque des retards de croissance. Chez l'adulte, une hypothyroïdie entraîne une diminution du métabolisme général [26].

1.1.4.2- Mécanisme d'action des hormones thyroïdiennes

Le mécanisme d'action des hormones thyroïdiennes iodées est le mécanisme général d'action des hormones apolaires. La T3 se fixe sur un récepteur intracellulaire localisé exclusivement dans le noyau cellulaire. Ce récepteur appartient à la superfamille des récepteurs d'hormones stéroïdes. L'interaction de l'hormone avec le récepteur nucléaire détermine l'activation d'un complexe hormone/récepteur possédant une forte affinité pour une séquence d'ADN, ou TRE (Thyroid Hormone Responsive Element). Il en résulte la modulation de la transcription de nombreux ARNm et donc l'expression de protéines, responsables des effets observés. La plupart des effets biologiques des hormones thyroïdiennes impliquent ce mode d'action.

Les hormones thyroïdiennes agissent aussi dans les mitochondries en favorisant le découplage des phosphorylations oxydatives [61].

1.1.5- Le métabolisme et l'élimination des hormones thyroïdiennes

Le foie est l'organe le plus actif dans la dégradation et l'élimination des hormones thyroïdiennes iodées. Le métabolisme hépatique se déroule en deux phases : la phase 1 consiste à dénaturer l'hormone puis la phase 2 consiste à réaliser une conjugaison des métabolites primaires à un groupement qui facilitera l'élimination biliaire ou urinaire.

Les réactions de phase 1 sont catalysées par des enzymes de la famille du cytochrome P450 monooxygénase. Le cytochrome P450 est lié aux membranes cellulaires du réticulum endoplasmique lisse. Il catalyse des réactions d'oxydations dépendantes de NADPH et de l'oxygène. Les hormones thyroïdiennes iodées vont alors être clivées en deux cycles aromatiques. Ce clivage conduit à la libération de MIT et de DIT. L'activité de ces enzymes est inductible par différentes substances organiques ou par des xénobiotiques, le métabolisme peut alors être accru.

Les réactions de phase 2 peuvent produire une grande variété de métabolites. Une faible partie des hormones peut être directement conjuguée par le glucuronate ou par le sulfate. Cette réaction de glucuroconjugaison est réalisée par l'UDP-glucuronosyltransférase. Ces

enzymes sont inductibles comme les cytochromes, par des molécules endogènes ou exogènes et leur activité est variable. La désamination oxydative de la T4 et de la T3 puis la décarboxylation des acides α -cétoniques formés conduit aux acides tétra- et tri-iodoacétiques qui peuvent être ultérieurement désiodés et donner l'acide thyroacétique. La décarboxylation de la T4 et de la T3 donne des amines primaires qui peuvent aussi être désiodées.

La sécrétion biliaire des métabolites entraîne une élimination avec les matières fécales. Une autre partie est déconjuguée par la flore digestive, réabsorbée et décrit un cycle entéro-hépatique. A la faveur de leur passage dans le sang, une partie des métabolites peut être éliminée dans l'urine.

1.1.6- Régulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien

La régulation de la sécrétion en hormones thyroïdiennes implique une activation *via* l'axe de stimulation hypothalamus-hypophyse et un rétrocontrôle négatif par la forme libre des hormones thyroïdiennes.

L'activité de la glande thyroïde est régulée en majeure partie par la libération de TSH (Thyroid-Stimulating Hormone) qui est une glycoprotéine antehypophysaire. Les cellules folliculaires de la thyroïde possèdent des récepteurs à la TSH qui, lorsqu'ils sont activés, entraînent l'activation d'une adénylate cyclase et une augmentation du taux d'AMPc intracellulaire. Ainsi, la régulation de la fonction thyroïdienne chez les individus normaux est déterminée par les facteurs qui régulent la synthèse et la sécrétion de TSH.

La production de TSH est majoritairement régulée par le rétrocontrôle négatif des hormones thyroïdiennes sur l'hypophyse et par la stimulation par la Thyroid-Releasing Hormone ou TRH qui est une neurohormone hypothalamique. La production de TRH est régulée par le rétrocontrôle négatif exercé par les formes libres des hormones thyroïdiennes sur l'hypothalamus. Elle est aussi régulée par différents stimuli extérieurs comme le stress, le froid et est soumise à un rythme circadien. Il semble que ce soit le rétrocontrôle négatif sur l'antéhypophyse qui ait une importance prépondérante pour freiner la sécrétion lors d'élévation des concentrations des formes libres de T3 et de T4 [9].

De cette manière, si les concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes libres diminuent, le rétrocontrôle négatif exercé sur l'hypothalamus et l'hypophyse va être réduit, permettant une augmentation de la sécrétion de TRH et de TSH qui va ensuite agir sur la thyroïde en accroissant la sécrétion de T4 et de T3.

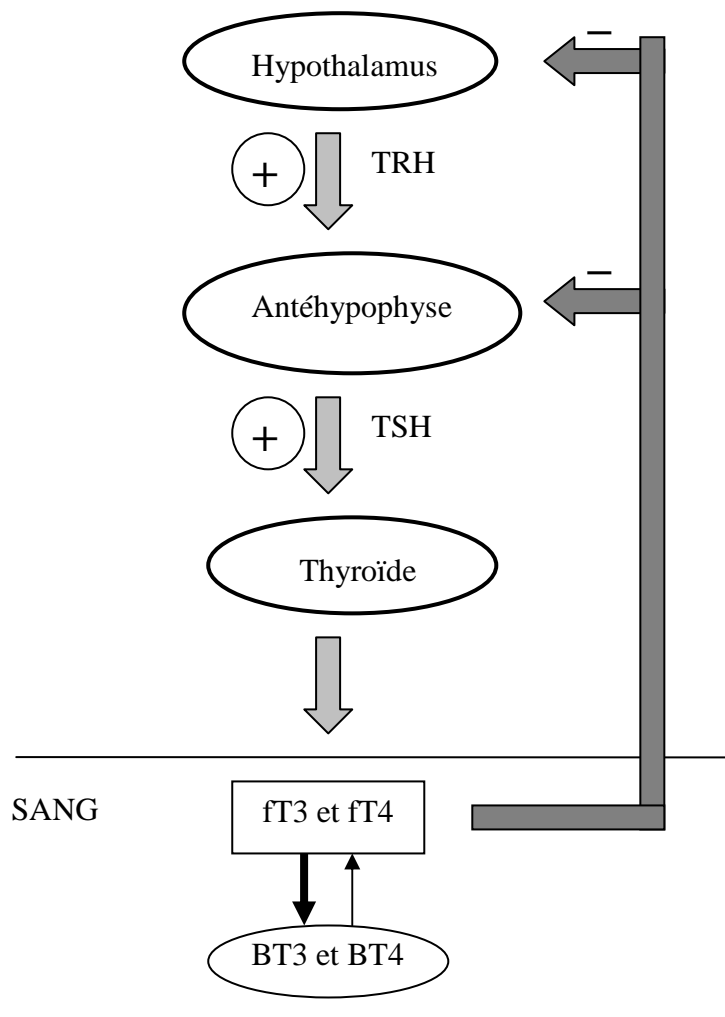


Figure 3 : Axe Hypothalamo-Hypophyso-Thyroïdien de régulation de la sécrétion des hormones thyroïdiennes. BT3 : T3 liée, BT4 : T4 liée, fT3 : T3 libre, fT4 : T4 libre, TRH : Thyroid-Releasing Hormone, TSH : Thyroid-Stimulating Hormone.

1.2- LE TRANSPORT PLASMATIQUE DES HORMONES THYROÏDIENNES

1.2.1- Les protéines de transport des hormones thyroïdiennes

Dans la circulation sanguine, les hormones thyroïdiennes iodées sont en presque totalité transportées par des protéines, la fraction libre représente en général moins de 1% de la concentration totale en hormone. Les concentrations en hormone thyroïdienne libre sont désignées, par convention, par fT3 et fT4 (f pour "free") et les concentrations en hormone

thyroïdienne totale par TT4 et TT3 (T pour "total"). Chez l'homme, la proportion de fT4 n'est que de 0.02 à 0.03%, elle est environ de 0.3% pour fT3.

La forme liée des hormones thyroïdiennes iodées ne peut pas traverser la membrane des cellules cibles, contrairement à la forme libre. Ainsi, la forme libre est considérée comme la forme active.

Du fait du très fort taux de fixation de T3 et de T4 aux protéines, des échanges importants d'hormone libre peuvent avoir lieu avec les organes cibles sans que la concentration totale plasmatique soit changée [10]. Ainsi, la concentration plasmatique totale renseigne peu sur l'état eu-, hypo- ou hyperthyroïdien d'un sujet. En effet, la concentration totale dépend très largement de la concentration des transporteurs plasmatiques des hormones thyroïdiennes iodées, or, cette dernière peut varier sous l'influence de nombreux facteurs n'ayant aucune origine thyroïdienne.

Les principales protéines de transport des hormones thyroïdiennes iodées sont la Thyroxin-Binding Globulin ou TBG, la Transthyréline ou TTR encore appelée Thyroxin-Binding Prealbumine ou TBPA et l'albumine. Beaucoup d'autres protéines plasmatiques peuvent transporter les hormones thyroïdiennes, comme des lipoprotéines de haute densité, mais leur contribution dans le transport de ces hormones est négligeable, que ce soit dans une situation physiologique ou pathologique [40].

1.2.1.1- La TBG

La TBG est une sialoglycoprotéine monomérique de 54kDa synthétisée par le foie. Chez l'homme, la concentration plasmatique de la TBG est faible (0.16 mg/mL, Tableau 1) et elle présente un seul site de liaison des hormones thyroïdiennes. Sa capacité de transport des hormones thyroïdiennes est donc limitée. La TBG possède une plus grande affinité pour la T4 que pour la T3, d'où son nom (Thyroxin-Binding Globuline). La demi-vie de la TBG est relativement longue chez l'homme, elle est de 5 jours [50]. Chez l'homme, c'est la protéine de transport des hormones thyroïdiennes la moins abondante puisque sa concentration est environ vingt fois moins importante que celle de la transthyréline et deux mille fois moins importante que celle de l'albumine [40]. Cependant, c'est la principale protéine de transport des hormones thyroïdiennes chez l'homme puisqu'elle transporte 70 à 75% de la T3 et de la T4, du fait de sa forte affinité pour les hormones thyroïdiennes [50] (Tableau 1).

Chez le rat, la TBG est présente de manière inconstante. En effet, bien qu'il existe un gène de la TBG, celle-ci n'est exprimée qu'en période post-natale, jusqu'à l'âge de 8 semaines, puis en

période de sénescence (à partir de 7 mois) [44]. Durant la période pendant laquelle le rat ne synthétise pas la TBG, le temps de demi-vie de la thyroxine est d'environ 12 heures, alors qu'elle est de 5 jours chez l'homme chez qui la TBG est exprimée [50].

1.2.1.2- La TTR

La transthyréline ou Thyroxin-Binding Prealbumine est présente chez toutes les espèces. C'est une protéine homotétramérique de 55kDa synthétisée par le foie et les plexus choroïdes. Elle possède deux sites de fixation des hormones thyroïdiennes et une affinité légèrement supérieure pour T4 que pour T3. La liaison d'une première molécule d'hormone thyroïdienne iodée au premier site diminue fortement l'affinité du deuxième site pour une autre hormone thyroïdienne. Chez l'homme, la TTR transporte environ 10 à 20% de T4 plasmatique, et la majorité de la T4 du liquide cébrospinal. Sa concentration plasmatique chez l'homme est environ 20 fois supérieure à celle de la TBG, sa contribution au transport des hormones thyroïdiennes est cependant moins importante [50] (Tableau 1).

La TTR est aussi connue pour former un complexe avec la protéine de transport du rétinol et pour jouer un rôle dans le transport de la Vitamine A [40]. La liaison entre la TTR et la RBP (Retinol-Binding Protein) ne modifie pas l'affinité de la TTR pour les hormones thyroïdiennes iodées.

1.2.1.3- L'albumine

L'albumine est une protéine de 69kDa synthétisée par le foie. L'albumine circule dans le sang principalement sous la forme d'un monomère. Elle peut s'agglomérer pour former des dimères, trimères ou tétramères. L'albumine peut lier un grand nombre de substances dont des hormones et des xénobiotiques possédant une région hydrophobe. Ainsi, l'association entre l'albumine et les hormones thyroïdiennes iodées n'est pas spécifique [10].

L'albumine a approximativement la même affinité pour T3 et T4 et présente un site de fixation à forte affinité et plusieurs sites à faible affinité. La demi-vie de l'albumine est relativement longue, elle est de 15 jours chez l'homme [40] (Tableau 1).

	TBG	TTR	Albumine
Poids moléculaire (kDa)	54	55	69
Structure	Monomère	Tétramère	Monomère
Nombre de sites de liaison	1	2	1 avec une grande affinité
Constante de dissociation pour T4 <i>Kd</i> (nmol/L)			
Homme	0.105	6.25	2780
Ovins	0.112	7.14	2860
Rat	–	2.78	1540
Capacité de liaison pour T4 <i>Bmax</i> (nmol/L)			(* 10 ⁶)
Homme	266.6	3229.6	51.3
Ovin	160	4494	35.2
Rat	–	1968.2	30.2
Pourcentage de T4 liée (%)			
Homme	73.3	18.9	7.8
Ovin	53.1	35.6	11.3
Rat	–	85.1	14.8
Concentration plasmatique chez l'homme (mg/mL)	0.16	2.5	400
Temps de demi-vie chez l'homme (j)	5	2	15

Tableau 1 : Caractéristiques des protéines de transport des hormones thyroïdiennes iodées [50]. *Bmax* est la concentration en site de liaison de la protéine de transport. Elle représente la capacité maximale de liaison. *Kd* est la concentration en hormones thyroïdiennes libres permettant de saturer la moitié des sites de liaison de la protéine de transport.

1.2.2- Les variations interspécifiques

Les concentrations basales et les concentrations libres en thyroxine varient peu entre l'homme, les ovins et le rat. Les concentrations totales en thyroxine sont cependant inférieures chez les ovins et le rat, par rapport à celles de l'homme (Tableau 2). Il faut noter cependant que chez les ovins, il existe des variations saisonnières dans les concentrations plasmatiques en TT4 puisqu'elles varient de 30 à 60 ng/mL.

	Sexe	Protéines totales (g/L)	TT4 (ng/mL)	fT4 (pg/mL)	Fraction libre de T4
Homme					
Normal	Mâle	74	62	25	0.04%
Déficient en TBG	Femelle	76	11	14	0.13%
Ovins	Femelle	62.5	36.5	17.5	0.05%
Rat	Mâle	66	37.8	24	0.06%

Tableau 2 : Paramètres de la fonction thyroïdienne chez l'homme, les ovins et le rat [41].

Il existe des similarités entre l'homme et les ovins d'un point de vue physiologie thyroïdienne. En effet, la TBG est la principale protéine de transport des hormones thyroïdiennes dans ces deux espèces car elle possède une forte affinité (Tableau 1), le Kd (concentration en hormones thyroïdiennes libres permettant de saturer la moitié des sites de liaison) et le Bmax sont similaires (concentration en site de liaison de la protéine de transport). Ces données suggèrent que les propriétés pharmacologiques de la TBG sont similaires dans ces deux espèces. Chez le rat, qui ne possède pas la TBG [44], c'est la TTR qui est la principale protéine de transport des hormones thyroïdiennes. C'est pourquoi, selon les industriels, l'évaluation toxicologique de xénobiotiques sur la fonction thyroïdiennes chez le rat est limitée de par cette particularité d'espèce. L'hypothèse couramment admise est que la TBG jouerait un rôle de réservoir des hormones thyroïdiennes et un rôle protecteur vis-à-vis des enzymes du catabolisme des hormones thyroïdiennes.

2- ETUDE DES PERTURBATEURS DE LA FONCTION THYROÏDIENNE

L'homme est continuellement exposé à de nombreux produits chimiques et certains de ces composés sont persistants dans l'environnement. Quelques études montrent qu'une exposition à de nombreux produits chimiques environnementaux peut engendrer une perturbation de l'axe thyroïdien. De plus, des perturbations de la fonction thyroïdienne même faibles peuvent avoir des conséquences négatives sur la santé et en particulier pour le fœtus humain qui est très sensible aux perturbations de l'homéostasie de la T4 et de la TSH, surtout au niveau du système nerveux central.

Les données de la littérature sur les effets perturbateurs thyroïdiens des xénobiotiques sont en constante augmentation, avec des études concernant l'exposition animale mais aussi des tests *in vitro* permettant de déterminer les mécanismes d'action de ces perturbateurs endocriniens.

2.1- LES PRINCIPALES MOLECULES QUI PERTURBENT LA FONCTION THYROÏDIENNE

En 1996, l'Agence de Protection Environnementale Américaine (EPA) a reçu une demande de la part de la "Food Quality Protection" et de la "Safe Drinking Water Acts" pour développer un programme de recherche sur les effets endocriniens de plusieurs composés chimiques. En réponse à cette demande, l'EPA a formé l'EDSTAC (Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee) [15]. Ainsi, depuis plusieurs années, les chercheurs se sont focalisés sur les effets des produits chimiques sur les différentes fonctions endocriniennes. Des études réalisées *in vitro* et *in vivo* montrent que la thyroïde est également très sensible aux effets perturbateurs de nombreux produits chimiques [4].

2.1.1- Les PCBs : biphényles polychlorés

▪ Description :

Les PCBs regroupent 209 molécules qui sont très persistantes et qui s'accumulent dans le tissu adipeux. Ils sont utilisés dans l'industrie électrique, l'industrie chimique des peintures, des papiers, des adhésifs, des mastics et autres plastiques. Leurs métabolites hydroxylés sont aussi biologiquement actifs. Les PCBs, ainsi que leurs métabolites hydroxylés possèdent un haut degré d'analogie structurale avec la T4 [4].

▪ Effets sur la fonction thyroïdienne :

L'effet le plus important de l'exposition aux PCBs chez le rat et la souris est la diminution des concentrations circulantes des hormones thyroïdiennes, et plus particulièrement de la T4 totale. Chez ces espèces, une hyperplasie de la thyroïde a été mise en évidence après une exposition orale et sous-cutanée [18].

Chez des singes exposés par voie orale à des PCBs pendant 18 et 23 semaines, une diminution significative et dose-dépendante de TT4, fT4 et TT3, une augmentation de la TSH ainsi qu'une modification histopathologique de la thyroïde ont été décrites [55].

Plusieurs études ont été menées pour connaître les effets de l'exposition des PCBs durant la gestation chez les rongeurs. Ces études ont montré que les PCBs s'accumulaient dans le foie et le cerveau des fœtus, et que les concentrations plasmatiques en TT4 étaient diminuées chez la mère et les fœtus. Chez le fœtus, les concentrations plasmatiques de fT4 étaient diminuées et les concentrations plasmatiques en TSH étaient augmentées [29].

Des études sur les effets d'une exposition accidentelle aux PCBs chez l'homme ont été réalisées et suggèrent que les niveaux environnementaux en PCBs peuvent altérer l'homéostasie thyroïdienne. Selon ces études, les PCBs provoqueraient une diminution des niveaux circulants des hormones thyroïdiennes et une augmentation des concentrations plasmatiques en TSH. Chez les sujets exposés, une hyperplasie de la thyroïde est observée par échographie, contrairement aux sujets qui n'ont pas été exposés aux PCBs [4].

2.1.2- Les dioxines

▪ Description :

Les polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs) et furans (PCDFs) sont très répandus dans l'environnement, ils sont persistants et ce sont des polluants environnementaux très toxiques. Ces PCDDs et PCDFs sont issus de processus d'incinération industrielle et de la production d'herbicides. Le 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxin (TCDD) est le chef de file de cette classe de produits chimiques et c'est le plus toxique des dioxines [4].

▪ Effets sur la fonction thyroïdienne :

Une étude a montré que l'exposition au TCDD chez le rat femelle gravide entraîne un passage de cette molécule à la progéniture *via* la voie placentaire et le lait [23]. Une dose unique de TCDD administrée chez le rat femelle gravide provoque une diminution des concentrations

circulantes en TT4, une augmentation des concentrations plasmatiques en TSH chez la mère et la progéniture, ainsi qu'une hyperplasie de la glande thyroïde [35].

Les études humaines sont rares mais une étude importante a été menée au Vietnam chez les vétérans de la Guerre du Vietnam et le groupe de vétérans qui a été le plus largement exposé au TCDD a montré une augmentation significative des niveaux de TSH [36].

2.1.3- Les retardateurs de flamme

▪ Description :

Le groupe des retardateurs de flamme contient différents produits chimiques comme le tetrabromobisphenol A (TBBPA), les polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) et les polybrominated biphenyls. Le TBBPA et les PBDEs montrent une nette analogie structurale avec la T4, tout comme les PCBs.

Les PBDEs sont largement utilisés comme retardateur de flamme dans la fabrication industrielle de plastiques, de peinture, de composants électriques et de tissus synthétiques. Le TBBPA est un dérivé halogéné du bisphenol A (BPA) et est très largement utilisé comme retardateur de flamme dans la fabrication d'équipement électrique comme les téléviseurs, les ordinateurs, les photocopieurs, les lecteurs vidéo et les imprimantes laser. Le TBBPA est généralement considéré comme un retardateur de flamme "sain" car il ne s'accumule pas dans l'environnement, bien qu'il soit toxique [4].

▪ Effets sur la fonction thyroïdienne :

Dans des études réalisées chez les rongeurs, les PBDEs réduisent les niveaux circulants des hormones thyroïdiennes. Le DE-71, un mélange commercial de PBDE provenant des USA, entraîne une diminution des niveaux circulants des hormones thyroïdiennes et induit l'activité d'enzymes hépatiques comme l'uridine-diphosphate-glucuronosyl-transferase (UDPGT). De fortes doses de DE-71 provoquent également des modifications de la structure histologique de la thyroïde, indiquant un état hypothyroïdien [13]. D'autres mélanges commerciaux de PBDEs induisent ce même type d'effets.

L'exposition maternelle périnatale de rats à différents mélanges de PBDEs diminue les concentrations plasmatiques des hormones thyroïdiennes, avant et après la naissance, aussi bien chez la mère que chez les fœtus [65].

Les connaissances sur les effets des retardateurs de flamme sur la fonction thyroïdienne chez l'homme sont limitées.

2.1.4- Les phénols : nonylphénol (NP), pentachlorophénol (PCP) et bisphénol A (BPA)

▪ Description :

Ces produits chimiques sont des additifs industriels utilisés dans la fabrication d'un nombre important de détergents, de plastiques et de pesticides. Le NP est l'un des composés les plus critiqués de par sa toxicité, sa persistance et ses effets œstrogéniques. Le PCP est largement utilisé comme biocide, conservateur du bois et agent antifongique dans de nombreuses industries. Le BPA est utilisé dans l'industrie de nombreux produits plastiques comme les compact-disques, les adhésifs, les peintures et les résines dentaires [4].

▪ Effets sur la fonction thyroïdienne :

Les effets d'une exposition au PCP chez le rat sont différents selon les études. En effet, ils engendreraient une augmentation de la sécrétion de TSH sans effet sur les hormones thyroïdiennes pour certains [33] et pour d'autres [45], ils provoqueraient une augmentation des concentrations en T3 et en T4 sans altération de la sécrétion de TSH.

Il existerait un lien entre l'exposition au BPA et l'activité de l'UDPGT. Une augmentation de l'activité de l'UDPGT pourrait alors accélérer le métabolisme des hormones thyroïdiennes.

Peu de données et d'études existent sur l'exposition humaine aux phénols. Le PCP pourrait altérer les niveaux d'hormones thyroïdiennes chez les nouveau-nés et pourrait donc provoquer des défauts de développement neurologique chez ces nouveau-nés [43].

2.1.5- Les phtalates

▪ Description :

Les phtalates sont largement utilisés dans l'industrie des plastiques et leur utilisation est en constante augmentation. L'exposition aux phtalates est inévitable et elle peut être massive dans certains groupes d'individus comme les nouveau-nés hospitalisés. En effet, l'exposition aux phtalates dans les structures médicales se fait par le contact avec certains dispositifs médicaux comme des sondes d'intubation [4].

▪ Effets sur la fonction thyroïdienne :

Des études réalisées chez des rongeurs montrent que la structure histologique de la thyroïde est altérée par l'exposition au DEHP (di(2-éthylhexyl)phtalates), DnOP (di-n-octyl phtalate) et

DnHP (di-n-hexyl phtalate), reflétant une hyperactivité de la glande thyroïde [37]. Chez le rat, une exposition orale au DEHP n'affecte pas les niveaux circulants en hormones thyroïdiennes. Cependant, une administration par voie intra veineuse à des doses correspondant aux niveaux de DEHP présents dans les sacs de transfusion veineuse chez l'homme entraîne une augmentation significative des concentrations plasmatiques de T3 et de T4, ces concentrations retournant à la normale 7 jours après l'exposition. L'histologie de la glande thyroïde a été étudiée et une hyperplasie réactive a également été mise en évidence [14].

Peu de données sont disponibles chez l'homme concernant les effets des phtalates sur la fonction thyroïdienne. Un suivi a été réalisé chez 19 adolescents qui ont largement été exposés au DEHP pendant leur période néonatale. Ce suivi n'a pas permis de montrer une altération des concentrations en hormones thyroïdiennes circulantes. Ces résultats ne seraient pas très représentatifs car l'exposition au DEHP a été forte mais de courte durée [38]. Les perturbations thyroïdiennes provoquées par une exposition environnementale au phtalates peuvent être transitoires, cette exposition pourrait cependant engendrer des effets permanents si elle perturbe le développement du système nerveux central [4].

2.1.6- Les parabènes

Les parabènes sont largement utilisés comme conservateurs des aliments, de produits cosmétiques et de produits pharmaceutiques. Des études récentes suggèrent que les parabènes possèdent des effets œstrogéniques, mais aucune étude ne s'est focalisée sur leurs effets sur la fonction thyroïdienne. Le méthylparabène semble posséder une activité antithyroïdienne *in vitro* par une inhibition dose-dépendante de l'organification de l'iode [4].

2.1.7- Les pesticides

Parmi tous les pesticides, les effets perturbateurs thyroïdiens du dichloro-diphényl-trichloro-éthane (DDT) et de l'hexa-chloro-benzène (HCB) sont les plus étudiés.

Une exposition au DDT provoquerait une diminution des concentrations plasmatiques en T4 chez les oiseaux ainsi qu'une augmentation du poids de la thyroïde et une diminution du contenu de la colloïde dans les follicules thyroïdiens [4].

Le HCB est métabolisé en PCP (pentachlorophénol) qui est un composé possédant des effets perturbateurs endocriniens. Une exposition prénatale au HCB chez des rats entraîne une diminution des concentrations plasmatiques en TT4 et en fT4 chez les ratons et une

augmentation de l'activité de l'UDPGT dans le foie et de la 5'desiodase de type II dans le cerveau. Ces modifications pourraient indiquer une augmentation du métabolisme de la T4 [32].

Chez l'homme, une étude a montré qu'une exposition prolongée au HCB provoque une diminution significative des concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes libres et une augmentation des concentrations plasmatiques en TSH [42].

2.2- LES MECANISMES D'ACTION DES MOLECULES PERTURBANT LA FONCTION THYROÏDIENNE

Depuis de nombreuses années, l'évaluation des effets anti-thyroïdiens des produits chimiques accumulés dans l'environnement se faisait par la mesure des niveaux circulants en hormone thyroïdienne, par la mesure de la taille de la thyroïde et par l'étude de l'histopathologie thyroïdienne. Or, depuis une dizaine d'années, de nouveaux critères ont été développés. En effet, il s'agit maintenant de s'intéresser à la production endogène de T4, à l'activité des gènes de transcription et à la croissance cellulaire. Ces nouveaux critères apparaissent comme étant plus sensibles quand il s'agit d'interpréter les effets perturbateurs endocriniens de nombreux produits chimiques [4]. En effet, pour exemple, le perchlorate n'engendre pas de variation des concentrations en hormones thyroïdiennes mais il diminue la production endogène de T4 par une inhibition du symport sodium-iode (NIS) permettant la capture d'iode dans la thyroïde [21].

Les mécanismes impliqués dans l'homéostasie thyroïdienne sont nombreux et complexes. Les produits chimiques peuvent agir à différents niveaux dans le système thyroïdien.

2.2.1- La synthèse des hormones thyroïdiennes : interférence avec le NIS, le TPO et les récepteurs de la TSH

Les perturbateurs endocriniens peuvent agir en inhibant la capture d'iode dans la cellule folliculaire thyroïdienne, c'est le cas du perchlorate. Un autre mécanisme d'action consiste à augmenter l'activité de la NIS et à accroître l'expression des ARNm de la NIS, comme les phtalates (DIDP, butyl-benzyl-phtalate ou BBP, DnOP). L'activité de la thyroperoxydase (TPO) est inhibée *in vitro* par le NP (nonylphénol).

L'activité de la thyroïde est stimulée par la TSH. Certains produits chimiques peuvent altérer la fonction des récepteurs à la TSH et ainsi perturber la synthèse des hormones thyroïdiennes.

Le DDT et les PCBs interfèrent *in vitro* avec les signaux émis après l'activation du récepteur à la TSH en inhibant l'activité de l'adénylate cyclase et la production d'AMPc [4].

2.2.2- Les protéines de transport

Les hydrocarbures aromatiques halogénés possèdent une analogie structurale avec les hormones thyroïdiennes et peuvent alors entrer en compétition au niveau des récepteurs des hormones thyroïdiennes et de leurs sites de liaison aux protéines de transport. Ainsi, les PCBs, les retardateurs de flamme, les phénols et les phtalates se lient de manière compétitive à la transthyrétine (TTR). De plus, les dérivés et les métabolites de ces composés possèdent une affinité encore plus grande que la molécule mère pour la TTR [30].

La TTR est la principale protéine de transport des hormones thyroïdiennes dans le cerveau humain, jouant un rôle essentiel dans la détermination des niveaux de FT4 dans le compartiment extracellulaire central. La TTR jouerait un rôle de transport de la T4 à travers la barrière hémato-encéphalique ainsi qu'un rôle dans le transport placentaire de la T4. Les xénobiotiques liés à la TTR peuvent circuler, grâce à la TTR, vers le fœtus et le cerveau fœtal et sont alors capables de diminuer les niveaux de T4 dans le cerveau fœtal [53].

2.2.3- Les mécanismes de capture cellulaire

Les hormones thyroïdiennes sont transportées activement à travers la membrane cellulaire *via* des transporteurs membranaires spécifiques. Un certain nombre de produits chimiques, comme le BBP (Butyl-benzyl-phtalate), inhibent la capture cellulaire de [¹²⁵I] T3 [49].

2.2.4- Les récepteurs aux hormones thyroïdiennes

Les xénobiotiques qui se retrouvent dans l'environnement peuvent altérer l'expression des gènes de transcription stimulés par les hormones thyroïdiennes dans les cellules cibles.

Les hormones thyroïdiennes se lient à des récepteurs aux hormones thyroïdiennes (TR α_1 et TR β) situés sur des gènes d'activation dans le noyau des cellules cibles. Ces gènes sont activés par les hormones thyroïdiennes. Le BPA agit comme un antagoniste de la T3 au niveau des récepteurs des hormones thyroïdiennes [31]. De la même manière, les PCBs interfèrent avec l'expression des gènes activés par les hormones thyroïdiennes (TH-responsive genes) en antagonisant la liaison des hormones thyroïdiennes à leur récepteur spécifique

Seiwa et al. ont étudié les effets du BPA sur l'OPC (Oligodendrocyte Precursor Cell) impliqué dans la différenciation de protéines de la myéline, composants majeurs de la myéline, et sur l'expression du 2,3-cyclic nucleotide 3-phosphodiesterase. Un traitement au BPA pendant 48h réalisé chez des souris a montré une diminution significative des niveaux de TR β ₁ dans les OPCs et les oligodendrocytes. Ces résultats suggèrent que le traitement au BPA a provoqué une suppression de la différenciation des OPCs en oligodendrocytes par la T3. De la même manière, le dicyclohexyl phtalate, le BBP et le PCP inhiberaient l'expression du gène du TR β [47].

2.2.5- La croissance neuronale

Le développement des oligodendrocytes et de la myélinisation est sous le contrôle des hormones thyroïdiennes, tout comme le développement des cellules de Purkinje. Toutes ces cellules sont essentielles dans la formation d'un circuit neuronal normal, ou synaptogenèse [4]. Une exposition périnatale au PCB modifie le développement de la matière blanche chez des rats en mimant certains effets d'une hypothyroïdie. Le PCB pourrait donc affecter le développement neurologique en perturbant la fonction thyroïdienne chez le rat [48].

2.2.6- Métabolisme et circulation des hormones thyroïdiennes

Les désiodases périphériques contrôlent la conversion des hormones thyroïdiennes dans différents organes et sont essentielles dans la régulation des niveaux en T3 biologiquement active. La 5'désiodase de type I est inhibée *in vitro* dans le foie par plusieurs produits chimiques environnementaux comme l'octylmethoxycinnamate, le 4-méthylbenzylidienecamphor (MBC), le méthoxychlor [4].

Le TCDD (2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxin) induit l'activité de l'UDPGT de manière dose-dépendante chez des rats adultes et chez des rats. De plus, le TCDD diminue l'activité de la 5'désiodase de type I dans le foie et le rein. L'UDPGT est une enzyme qui catalyse plusieurs substances en des acides glucuroniques, l'augmentation de son activité provoque une augmentation du métabolisme des hormones thyroïdiennes [35].

2.3- LES CONSEQUENCES SUR L'ORGANISME DES PERTURBATIONS THYROÏDIENNES

2.3.1- Apparition de troubles fonctionnels

Les perturbateurs endocriniens ont des effets sur l'organisme humain car ils miment les effets des hormones endogènes ou ils sont des antagonistes des hormones endogènes, ils peuvent ainsi perturber la synthèse et le métabolisme des hormones endogènes.

Chez l'adulte, les perturbateurs endocriniens peuvent engendrer un état d'hyperthyroïdie ou un état d'hypothyroïdie et donc tous les troubles associés à ces états.

Le développement du fœtus dépend des hormones thyroïdiennes maternelles jusqu'au second semestre de grossesse. Ainsi, les facteurs environnementaux possèdent un impact très important durant le développement fœtal, surtout en ce qui concerne le développement du cerveau fœtal. En effet, chez les enfants nés de mère hypothyroïdienne, des difficultés de repères spatiaux, de perception, de mémoire ou encore de langage ont été observées avec une incidence plus élevée.

Les hormones thyroïdiennes sont nécessaires et essentielles pour la formation des neurones, de la myéline, pour le développement des synapses. La thyroïde fœtale commence à se développer à la fin du premier trimestre de grossesse. Elle ne produit pas encore ses propres hormones avant le second trimestre de grossesse et l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien n'est mature qu'à partir du troisième trimestre. Cependant, les hormones thyroïdiennes maternelles continuent à être nécessaires jusqu'à la naissance car le développement du cerveau fœtal commence bien avant que le système thyroïdien du fœtus soit efficace [5].

2.3.2- Carcinogénèse thyroïdienne

De nombreux xénobiotiques sont connus comme étant des carcinogènes de la thyroïde chez les rongeurs. Ces produits chimiques engendrent une carcinogénèse thyroïdienne selon deux modes d'action: par activité mutagène et par perturbation des fonctions thyroïdienne et hypophysaire [19]. L'activité mutagène ne paraît pas être le mode de carcinogénèse thyroïdienne le plus répandu, la perturbation de l'axe hypophyso-thyroïdien semble être plus importante. Le plus souvent, une hyperplasie des cellules folliculaires thyroïdiennes est notée avec une diminution des niveaux circulants en hormones thyroïdiennes (T4 et/ou T3) et une augmentation des concentrations sanguines en TSH.

3- LE FIPRONIL

Le fipronil est une substance chimique insecticide dont la mise sur le marché est autorisée depuis 1994 pour lutter contre les ravageurs de cultures, les puces d'animaux de compagnie... Il entre dans la composition de nombreuses préparations phytosanitaires pour l'agriculture professionnelle ou les jardiniers amateurs, de médicaments vétérinaires (*Frontline*® commercialisé par Merial) ou de biocides à usage domestique ou professionnel. Sur le plan de la réglementation des produits phytosanitaires, en France, le fipronil est autorisé dans la composition de préparations bénéficiant d'une autorisation de mise sur le marché. Cependant, il a fait l'objet d'importantes restrictions d'emploi pour son utilisation en protection des cultures. Il est en cours de réévaluation dans le cadre de la directive 91/414/CEE qui prévoit le réexamen systématique de toutes les substances existantes utilisées à des fins phytosanitaires. En février 2004, en raison de ces incertitudes, le gouvernement français a suspendu l'autorisation d'emploi de plusieurs préparations phytosanitaires contenant du fipronil, notamment le *Régent*®. En effet, le fipronil est soupçonné de provoquer des mortalités sur les populations d'abeilles domestiques.

3.1- STRUCTURE

C'est une molécule de la famille des phénylpyrazoles. Le fipronil est encore appelé 5-amino-3-cyano-1-(2,6-dichloro-4-trifluorométhylphényl)-4-trifluorométhylsulfinylpyrazole (Figure 4).

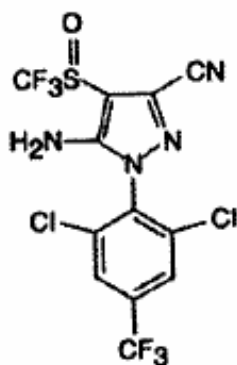


Figure 4 : Structure chimique du fipronil

3.2- MODE D'ACTION

La cible principale du fipronil est le récepteur GABA (Acide γ -amino-butérique) des invertébrés. Il agit principalement à ce niveau en bloquant les canaux chlorures activés par le GABA. Le GABA est un neurotransmetteur inhibiteur majeur dans le cerveau. Les récepteurs GABA des invertébrés seraient relativement proches des récepteurs GABA_A présents chez l'homme [39]. Le récepteur GABA_A est un important site d'action de nombreux produits chimiques comme les barbituriques, les benzodiazépines, la picrotoxine, les anesthésiques généraux et les insecticides. Ce récepteur possède plusieurs sites de liaison : celui du GABA, celui des benzodiazépines, celui des barbituriques et celui de la picrotoxine. Le récepteur GABA_A possède six sous unités α , trois sous unités β , trois sous unités γ et une sous unité δ . Dans le cerveau, le récepteur possède les sous unités α_1 , β_2 et γ_2 . La sélectivité du fipronil pour les récepteurs GABAergiques est variable et serait conditionnée par la nature des autres sous unités. L'activation du récepteur GABAergique faciliterait la liaison du fipronil mais ne modifierait pas l'affinité du récepteur pour le fipronil. Le fipronil se fixe sur un site de liaison proche de celui de la picrotoxine [20].

Le fipronil aurait également pour cible des récepteurs au glutamate qui commandent l'ouverture des canaux chlorures, et qui ne sont présents que chez les invertébrés. Chez les insectes, le fipronil antagoniserait à la fois les récepteurs GABAergiques et les récepteurs au glutamate, ceci permettrait d'expliquer la plus grande toxicité du fipronil chez les insectes que chez les mammifères [64].

3.3- METABOLISME

Les deux métabolites principaux du fipronil sont le fipronil désulfinyl et le fipronil sulfone. Ce dernier est le catabolite principal du fipronil chez les mammifères, il est obtenu par sulfoxydation du groupement thioéther du fipronil (Figure 6). Le fipronil désulfinyl est le résultat de la photodégradation du fipronil, il est exclusivement retrouvé dans l'environnement (Figure 5).

Le fipronil sulfone agit comme le fipronil sur les récepteurs GABA, cependant, il est 6 fois plus sélectif pour les récepteurs GABA des vertébrés que le fipronil [16].

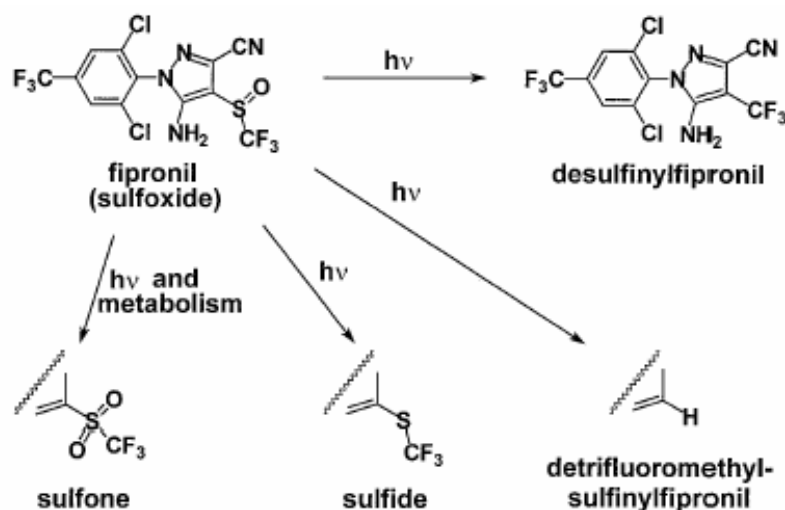


Figure 5 : Photodégradation du fipronil dans l'environnement [17].

Le métabolisme du fipronil se fait dans le foie grâce à des enzymes hépatiques et plus particulièrement les cytochromes P450. Le CYP3A4 est l'isoforme des cytochromes P450 prédominante responsable de la sulfoxydation du fipronil en fipronil sulfone [51]. La grande activité du CYP3A4 dépend de la co-expression du cytochrome b5. En effet, en l'absence d'expression du cytochrome b5, l'activité du CYP3A4 pour le fipronil est considérablement diminuée. Une autre isoforme est aussi responsable du catabolisme du fipronil, mais dans une moindre mesure, il s'agit du CYP2C19. Tang et al. [51] ont montré que le fipronil pourrait interagir et entrer en compétition avec d'autres substrats du CYP3A4, provoquant une diminution du métabolisme et l'élimination de ces substrats, comme c'est le cas pour le diazépam et la testostérone. Ces observations sont valables à la fois chez l'homme et le rat, ils possèdent tous deux le même équipement enzymatique. Les constantes d'affinité du fipronil, K_m , sont identiques chez l'homme et le rat, cependant, sa vitesse d'élimination, V_{max} , est supérieure chez le rat. Ceci indique que la clairance du fipronil chez le rat est plus importante que chez l'homme [51].

Das et al. ont mené une étude sur les effets du fipronil sur l'induction des cytochromes P450 hépatiques humains [7]. Cette étude a montré que le fipronil ainsi que son métabolite principal, le fipronil sulfone, induisent de manière dose-dépendante certains cytochromes P450, et plus particulièrement les isoformes CYP1A1 et CYP3A4. La cytotoxicité hépatique a aussi été mise en évidence dans cette étude puisque le fipronil et le fipronil sulfone induisent la caspase 3/7 ainsi que la protéine Fas et augmentent l'activité de l'adénylate kinase dans les hépatocytes. Ces trois paramètres sont des marqueurs importants de processus apoptotique cellulaire. Ainsi, le fipronil et ses métabolites possèdent plusieurs modes d'action au niveau hépatique. Ils induisent les CYP3A4 et CYP1A1, pouvant entraîner une interaction avec d'autres xénobiotiques ou des hormones endogènes, comme les hormones thyroïdiennes. De plus, le CYP1A1 n'est pas une enzyme constitutive dans le foie mais induite et est impliquée dans l'activation de pro-carcinogènes et de pro-mutagènes. Enfin, ils possèdent des effets cytotoxiques évidents sur les hépatocytes humains.

Rapport-Gratuit.com

PARTIE 2 : REALISATIONS EXPERIMENTALES

1- INTRODUCTION A LA PARTIE EXPERIMENTALE

Des études toxicologiques de perturbation endocrinienne ont été menées chez le rat. Chez cette espèce, le fipronil semble affecter la fonction thyroïdienne. En effet, les études toxicologiques montrent une perturbation thyroïdienne caractérisée par une diminution des concentrations plasmatiques en thyroxine et par une augmentation des concentrations plasmatiques en TSH. Ces études ont aussi montré que le fipronil provoquait une augmentation de la clairance plasmatique et biliaire de T4 radioactive (^{125}I) [54]. Le schéma physiopathologique hypothétique déduit de ces expériences consiste en une augmentation de l'élimination hépatique de T4 suite à une induction des enzymes hépatiques par le fipronil conduisant à une diminution des concentrations plasmatiques en T4. Le rétrocontrôle négatif exercé par la T4 sur l'hypothalamus et l'hypophyse est alors réduit, exposant le rat à des concentrations plasmatiques en TSH élevées, favorisant une carcinogenèse thyroïdienne. L'objectif de notre étude était donc de valider ce schéma physiopathologique hypothétique déduit des résultats des études toxicologiques.

Une étude pilote avait été réalisée au laboratoire sur des rats femelles ovariectomisés afin de déterminer les concentrations plasmatiques en fipronil et en fipronil sulfone, son principal métabolite, lors d'un traitement au fipronil dont les études toxicologiques avaient montré le potentiel perturbateur thyroïdien. Cette expérience a permis de déterminer l'impact de cette exposition sur les concentrations plasmatiques en T4 et en TSH, montrant une augmentation significative des concentrations plasmatiques en TSH chez les rats traités au fipronil. Cependant, cette étude n'a pas permis de conclure quant à l'effet du fipronil sur les concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes car les valeurs observées étaient supérieures aux valeurs physiologiques. Ces valeurs anormalement élevées ont été attribuées à une interférence avec le protocole d'anesthésie qui associait la médétomidine à la kétamine [6].

Dans un premier temps, nous avons réévalué les effets du fipronil sur les concentrations en hormones thyroïdiennes et en TSH chez le rat en veillant à éliminer tout biais lié à l'anesthésie. Dans un deuxième temps, nous avons examiné l'hypothèse selon laquelle la

perturbation de la fonction thyroïdienne résulte d'une augmentation de la clairance des hormones thyroïdiennes.

Selon les industriels, les effets observés chez le rat ne peuvent pas être extrapolés à l'homme car le rat adulte n'exprime pas la TBG [44], la principale protéine de liaison des hormones thyroïdiennes chez l'homme. Il est couramment admis que la TBG jouerait un rôle protecteur vis-à-vis des enzymes du catabolisme des hormones thyroïdiennes. Selon cette hypothèse, le fipronil ne modifierait pas la clairance des hormones thyroïdiennes chez une espèce exprimant la TBG. Afin de tester cette hypothèse, nous avons développé une approche expérimentale pour comparer l'effet du fipronil sur la clairance de la T4 chez le rat exprimant ou non la TBG.

2- MATERIEL ET METHODES COMMUNS AUX TROIS EXPERIENCES

2.1- ANIMAUX

Des rats femelles de race Wistar ont été utilisés. Ils ont été logés dans une armoire à rongeurs en veillant à séparer les animaux traités des animaux contrôles. Le cycle lumineux a été inversé de telle sorte que la phase d'activité des rats se situe pendant les manipulations. Il s'agit d'un cycle 12L-12D inversé, la période de lumière s'étalant de 22h00 à 10h00 et celle d'obscurité de 10h00 à 22h00. Les rats ont été nourris *ad libitum* avec un aliment pour rongeurs (Harlan, T2016) et de l'eau a été à leur disposition *ad libitum*.

Chaque animal a été identifié individuellement avec un numéro inscrit sur la queue avec un marqueur indélébile. Chaque rat a été pesé deux fois par semaine.

2.2- PREPARATION DES SOLUTIONS

2.2.1- Préparation de la suspension de fipronil

Le fipronil employé est du ((+/-)-5-amino-1-(2,6-dichloro-alpha, alphatriméthylfluoro-p-tolyl)-4-trifluorométhylsulfinylpyrazole-3-carbonitrile), fourni par 3B Medical Systems, inc (Libertyville, IL), de pureté égale à 95.6%. Le fipronil se présente sous la forme d'une poudre blanche, il est photosensible et sa solubilité dans l'eau est de 2 mg/L.

Le fipronil a été mis en suspension dans une solution de méthyl cellulose (0.5% w/w) et de Tween 80 (0.01% w/v).

La suspension a été conservée à 4°C à l'abri de la lumière. Un échantillon de la suspension a été prélevé sous agitation une fois par semaine après gavage des rats et mis dans un tube Eppendorf ambré conservé à -20°C afin de vérifier la stabilité de la suspension.

2.2.2- Préparation de la solution de T3

Une solution mère de triiodothyronine (Sigma, France) a été réalisée dans une solution de NaOH 0.4M et éthanol 60% puis elle a été diluée au 100^e dans du sérum physiologique (NaCl 0.9%) contenant 5.5% (w/v) de bicarbonates.

La solution a été conservée à 4°C dans une bouteille en verre ambré.

2.2.3- Préparation de la solution de T4

▪ Détermination de la dose de T4 à administrer pour l'étude de la clairance de T4 :

Pour être proche des conditions physiologiques, nous avons choisi d'administrer une dose de T4 qui permette d'atteindre une concentration plasmatique maximale de 30 à 60 ng/mL, c'est-à-dire de l'ordre des concentrations physiologiques de T4.

Cette dose a été déterminée à partir de l'équation 1 :

$$\text{Dose de T4} = C_{\max} \times V_D \quad \text{Equation 1}$$

Avec C_{\max} : concentration plasmatique maximale (30 ng/mL)

V_D : volume de distribution de la T4

D'après la littérature, chez le rat, $V_D = 20 \text{ mL/kg BW}$ [11].

A partir de l'équation 1 et de la valeur de V_D , nous avons choisi d'administrer la T4 à la dose de $10 \mu\text{g/kg BW}$ pour l'expérience 2 de manière à être sûr de pouvoir suivre l'évolution temporelle des concentrations plasmatiques en T4. La T4 avait été administrée à la dose de $12 \mu\text{g/kg BW}$ lors de l'essai pilote.

▪ Détermination de la voie d'administration de la T4 :

Pour des raisons techniques, la T4 a été administrée par voie IP plutôt que par voie IV dans l'expérience 2 car nous avons estimé que l'effet de 1^{er} passage hépatique sur la clairance de la T4 est négligeable. En effet, la clairance totale peut être décomposée selon l'équation 2 :

$$CL_T = CL_H + CL_R \quad \text{Equation 2}$$

Avec CL_T : Clairance totale CL_H : Clairance hépatique CL_R : Clairance rénale

Si on considère que la clairance est essentiellement hépatique, $CL_T = CL_H$. Les données toxicologiques [54] donnent une valeur de la clairance de la T4 de 0.17 mL/min.kg .

La clairance hépatique peut être déterminée selon l'équation 3 :

$$CL_H = Q_H \times E_H \quad \text{Equation 3}$$

Avec Q_H : Débit sanguin hépatique E_H : Coefficient d'extraction hépatique

Le débit sanguin hépatique peut être calculé selon l'équation 4 :

$$Q_H = 0.3 \times DC \text{ (mL/min.kg)} \quad \text{Equation 4}$$

Avec DC : Débit cardiaque

Le débit cardiaque donné dans la littérature est $DC = 300 \text{ mL/min.kg}$ [58].

On obtient $Q_H = 27 \text{ mL/min}$.

$CL_{T4} \ll Q_H$ donc $CL_H \ll Q_H$ d'où $E_H \ll 1$.

$E_H \ll 1$ donc l'effet de premier passage hépatique est négligeable.

Il a donc été possible d'administrer la T4 par voie IP plutôt que par voie IV.

▪ Préparation de la solution de T4 :

Une solution mère de L-thyroxine (Sigma, France) à 1 mg/mL a été réalisée dans une solution de NaOH 0.4M et éthanol 60% puis elle a été diluée au 100^e dans une solution de PBS (Phosphate Buffered Saline) stérile à 10 mM et pH 7.4 contenant 0.1% (w/v) de BSA (Bovine Serum Albumine) pour obtenir une solution de T4 à $10 \text{ }\mu\text{g/mL}$.

La solution a été conservée à 4°C à l'abri de la lumière.

2.3- THYROÏDECTOMIE ET MISE EN PLACE DES CATHETERS

Les rats ont été thyroïdectomisés et ont été équipés d'un cathéter intravasculaire mis à demeure dans la veine fémorale sous anesthésie générale obtenue par une administration IP d'un mélange de médétomidine (Domitor®) et de kétamine (Imalgène® 1000). Les posologies des anesthésiques ont été de 0.2 mg/kg BW de médétomidine et de 40 mg/kg BW de kétamine. Des administrations SC de Lacatate de Ringer tiédi sont réalisées le jour de la chirurgie (10 mL) puis les jours suivants (5 mL) pendant une semaine pour éviter tout risque d'hypocalcémie liée à d'éventuelles lésions des parathyroïdes lors de la chirurgie.

2.3.1- Thyroïdectomies

Le rat a été tout d'abord rasé dans la région du cou puis une asepsie a été réalisée grâce à de la povidone iodée (Vétédine® savon et solution) et de l'alcool. Une incision médiane de 2 cm de long a été réalisée avec un bistouri en partant de la base du cou. Le tissu conjonctif sous-cutané et les glandes salivaires ont été disséqués avec des ciseaux jusqu'à l'apparition des muscles. Ces muscles ont été disséqués dans le sens de la longueur puis un écarteur a été mis en place de manière à dégager la trachée et la thyroïde. Une pince fine a été passée sous l'isthme de la thyroïde puis l'isthme a été sectionné. Grâce à des cotons-tiges stériles, chaque lobe de la thyroïde a été disséqué et retiré en prenant soin à ne pas léser les nerfs laryngés récurrents situés de chaque côté de la trachée. Les muscles, les glandes salivaires et le tissu

conjonctif sous-cutané ont été remis en place. Un surjet sous-cutané a été réalisé grâce à du fil Vicryl® 3/0 puis des points simples ont été réalisés avec du fil Ethylon® 3/0. Une désinfection locale de la plaie a ensuite été effectuée avec de la povidone iodée (Vétédine® solution).

2.3.2- Mise en place des cathéters

Les cathéters ont été placés dans la veine fémorale sous anesthésie générale.

Le rat a été rasé sur la face interne de la cuisse puis une asepsie a été réalisée avec de la povidone iodée (Vétédine® savon et solution) et de l'alcool. Une incision cutanée de 2 cm de long a été faite le long de la face interne de la cuisse. Le tissu conjonctif sous-cutané a été disséqué grâce à des ciseaux de manière à dégager la veine fémorale et un écarteur a été mis en place. La veine fémorale a été disséquée plus finement pour l'isoler de l'artère fémorale et un crochet a été passé dessous de manière à la mettre sous tension. Le biseau d'une aiguille 21G a été courbé à 90°. Celle-ci a été utilisée pour encocher la veine fémorale et glisser le cathéter dans la veine sur 5 cm. Le cathéter a ensuite été fixé aux muscles avec un bout de compresse hémostatique (Surgiced®) et de la colle chirurgicale (Vétibond®). Grâce à un trocart, le reste du cathéter a été tunnélisé sous la peau de l'animal de manière à ce qu'il ressorte derrière sa tête. Il a ensuite été fixé dans un pli de peau avec du fil Ethylon® 3/0. Un surjet sous-cutané a été réalisé avec du fil Vicryl® 3/0 puis des points simples cutanés avec du fil Ethylon® 3/0 pour refermer l'incision de la cuisse. Une désinfection locale de la plaie a été réalisée avec de la povidone iodée (Vétédine® solution).

A la fin de l'intervention chirurgicale, le cathéter a été rempli d'héparine diluée à 2500 UI/mL puis obturé par brûlure de l'embout jusqu'à la cinétique.

2.4- MODALITES DE TRAITEMENT DES ECHANTILLONS DE SANG

Les échantillons de sang ont été centrifugés à 4000 tours/minute (1300 g) pendant 10 minutes à 4°C puis ont été aliquotés et conservés à -20°C jusqu'au moment de la réalisation des dosages.

2.5- MODALITES D'ANALYSE DES ECHANTILLONS

▪ Dosage de la T3 et de la T4 :

Les concentrations plasmatiques en T3 totale et T4 totale ont été déterminées par méthode radio immunologique ou RIA (DPC Coat-A-Count, Los Angeles CA). Les valeurs des sensibilités des techniques de dosage sont de 7 ng/dL pour la TT3 et de 0.25 µg/dL pour la TT4. Les coefficients de variation intradosage et interdosage ont été évalués respectivement à 8.9% et 10.0% pour la TT3 et à 3.8% et 14,5% pour la TT4.

▪ Dosage de la TSH :

Les concentrations plasmatiques en TSH ont aussi été déterminées par méthode radio immunologique ou RIA (Biotrak, Amersham Biosciences, UK). La valeur de sensibilité de cette technique de dosage est évaluée en déterminant la concentration de TSH permettant de déplacer 50% du marqueur. Cette valeur est de 0.86 ng/mL. Les coefficients de variation intradosage et interdosage ont été évalués à 13.2% et 4.8% respectivement.

▪ Dosage du fipronil et du fipronil sulfone :

Les concentrations plasmatiques en fipronil et en fipronil sulfone ont été évaluées par chromatographie liquide haute performance (méthode HPLC) en phase inverse couplée à une détection par UV (longueur d'onde de 275nm) après extraction et concentration des échantillons. L'extraction a été réalisée à partir de 500 µL de plasma surchargé avec 200 µL d'une solution de standard interne (2-(4-chlorophenyl) 5 Methyl 2H Pyrazol, Aldrich, 1 µg/mL) et 100 µL d'eau. Ce mélange a été passé sur une colonne de silice greffée en C8 (Bond Elut Variant 100 mg) et élué avec 1 mL de Méthanol. Après évaporation sous vapeur d'azote à 40°C, le culot a été repris avec 100 µL d'une solution de Méthanol à 50%. Le dosage du fipronil a été réalisé sur 50 µL de chacun des échantillons concentrés. La phase stationnaire est constituée d'une colonne de silice greffée en C18 (Nucleosil 3µm 125*4 Bischoff). La phase mobile est une solution d'acide acétique 0.005 N et Méthanol (33/67; v/v) et a été injectée par une pompe isocratique à un débit constant de 400 µL/min. Les échantillons et la gamme standard réalisée dans du plasma sont extraits simultanément. La limite de quantification (LOQ) du dosage est respectivement de 25 ng/mL et 50 ng/mL pour le fipronil et le fipronil sulfone.

3- EXPERIENCE 1 : EFFET DU FIPRONIL SUR LES CONCENTRATIONS EN HORMONES THYROÏDIENNES ET EN TSH CHEZ LE RAT FEMELLE

3.1- OBJECTIFS DE L'ETUDE

Cette étude a été réalisée afin de déterminer les effets du fipronil sur les concentrations en hormones thyroïdiennes et en TSH. Les études toxicologiques réalisées par les industriels chez le rat montrent une diminution des concentrations plasmatiques en T4 et une augmentation des concentrations plasmatiques en TSH dès 7 jours de traitement au fipronil à 30 mg/kg d'aliment par voie orale, soit une dose estimée de 2.85 mg/kg/j ingéré [1, 54].

Pour cette raison, nous avons choisi d'administrer le fipronil quotidiennement par sondage gastro-œsophagien à la dose de 3 mg/kg BW pendant 14 jours ou 28 jours. Le même traitement sera ultérieurement utilisé (expérience 2) pour montrer que la perturbation thyroïdienne induite par le fipronil résulte d'une augmentation de la clairance de la T4.

3.2- MATERIEL ET METHODES

3.2.1- Animaux

Les rats femelles de race Wistar étaient âgés de 4 mois au moment de l'étude. Ils étaient logés à 2 ou 3 par cage.

3.2.2- Méthodologie expérimentale

3.2.2.1- Plan expérimental (Figure 7)

Les 28 rats ont été répartis de façon aléatoire en 4 lots :

- 7 rats contrôles sacrifiés après 14 jours de traitement.
- 7 rats contrôles sacrifiés après 28 jours de traitement.
- 7 rats traités au fipronil sacrifiés après 14 jours de traitement.
- 7 rats traités au fipronil sacrifiés après 28 jours de traitement.

A J0, les rats ont été répartis dans chaque lot, ils ont été identifiés et pesés.

A J2, le traitement au fipronil a été débuté par voie orale à raison de 3 mg/kg/j. Les rats contrôles ont été gavés avec le milieu de suspension du fipronil.

A J15, les rats contrôles et traités au fipronil pendant 14 jours ont été sacrifiés.

A J29, les rats contrôles et traités au fipronil pendant 28 jours ont été sacrifiés.

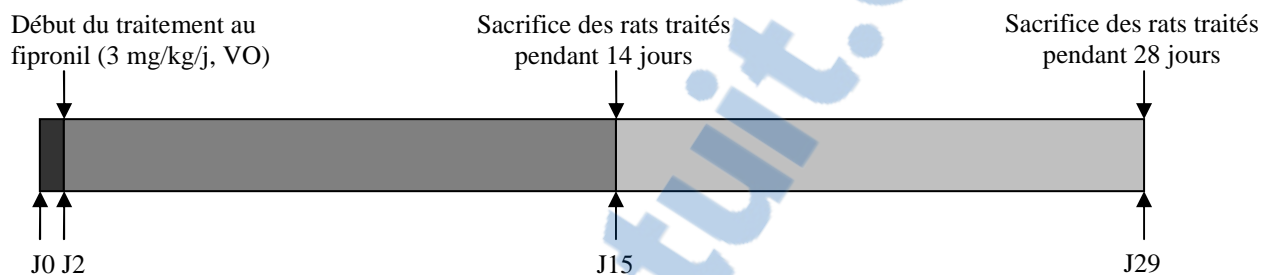


Figure 7 : Plan expérimental de l'expérience 1.

3.2.2.2- Modalités de traitement des animaux au fipronil

La suspension de fipronil à la concentration de 1.5 mg/mL a été agitée pendant 30 minutes avant les administrations et a été administrée quotidiennement par sondage gastro-œsophagien au début de la phase nocturne (10h00). Les volumes à administrer ont été réévalués toutes les semaines en fonction du poids corporel et ont été prélevés sous agitation de la suspension. La même procédure a été utilisée pour calculer le volume du milieu de suspension de fipronil à administrer aux rats contrôles.

3.2.2.3- Modalités de collecte des échantillons

Le sang total a été collecté par décapitation puis récupéré dans un tube hépariné (héparinate de lithium) *via* un entonnoir en verre dédié à chaque animal. Le sacrifice a été réalisé environ 24 heures après la dernière administration et 1 heure après le début de la phase nocturne. Une alternance entre animaux traités et animaux contrôles a été respectée.

3.2.2.4- Modalités de traitement des échantillons

Les échantillons ont été aliquotés de la façon suivante :

- 2 aliquots de 260 µL de plasma hépariné pour le dosage de fipronil et de fipronil sulfone.
- 3 aliquots du reste de plasma hépariné réparti équitablement pour les dosages des hormones thyroïdiennes (T3, T4) et de TSH.

3.2.3- Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous la forme de moyenne \pm écart-type (ET). Les données concernant les concentrations plasmatiques des hormones thyroïdiennes et en TSH ont été analysées avec le logiciel *Systat*® (*Systat 10, Systat Software Inc., Richmond, California, USA*).

Une analyse de variance à deux facteurs (traitement et durée du traitement) a été réalisée pour analyser l'effet du fipronil sur les concentrations en hormone thyroïdienne et en TSH selon le modèle défini par l'équation 5 :

$$Y_{ij} = \mu + F_i + T_j + F_i * T_j + \varepsilon_{ij} \quad \text{Equation 5}$$

Y_{ij} est la réponse observée pour le traitement i pendant une durée j de traitement

F_i est l'effet du traitement i .

T_j est l'effet de la durée j du traitement.

$F_i * T_j$ est l'effet de l'interaction du traitement i avec la durée j du traitement.

ε_{ij} est le terme d'erreur du modèle.

Une valeur de $P < 0.05$ a été considérée comme significative.

3.3- RESULTATS

3.3.1- Suivi du poids des rats

▪ Rats sacrifiés à J14 :

La figure 8 illustre l'évolution des poids corporels moyens (\pm ET) des rats des lots contrôles et des lots traités au fipronil pendant 14 jours.

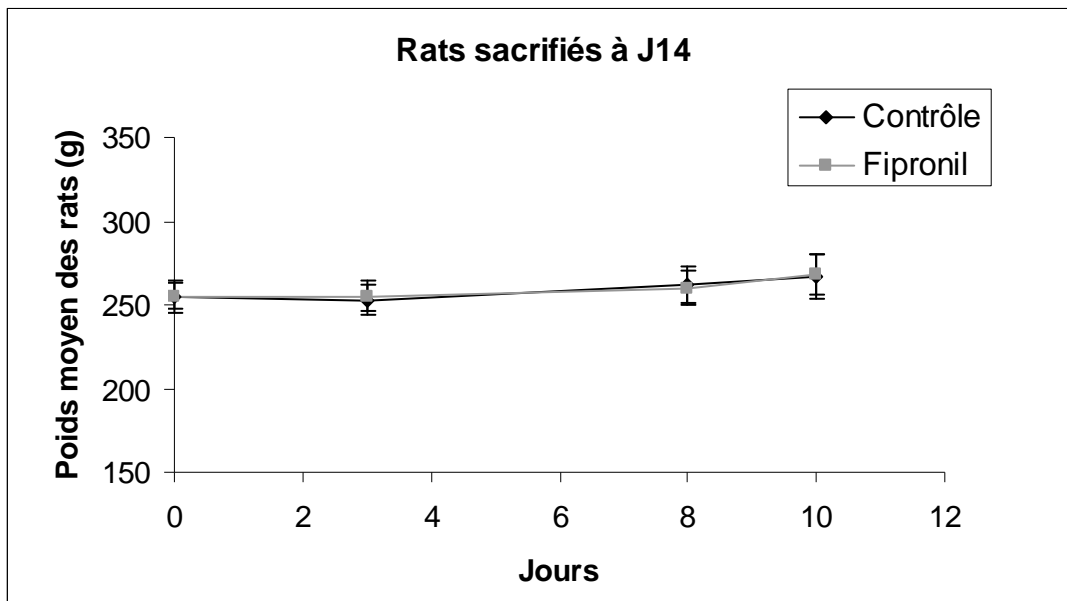


Figure 8 : Evolution des poids corporels moyens (\pm ET) des rats des lots contrôles et des lots traités pendant 14 jours. A partir de J0, les animaux ont reçu quotidiennement par VO une administration de fipronil (3 mg/kg/j) ou du milieu de suspension pendant une période de 14 jours, les pesées ont été bi-hebdomadaires.

L'examen visuel du graphique montre que le traitement n'a pas eu d'effet sur le poids moyen des animaux. Avant le début du traitement, les poids moyens des animaux des lots contrôles et traités étaient respectivement de 255.3 ± 7.4 g et 254.7 ± 9.4 g. A la fin du traitement, les poids moyens des animaux des lots contrôles et traités étaient respectivement de 267.0 ± 13.0 g et 268.4 ± 11.8 g.

▪ Rats sacrifiés à J28 :

La figure 9 illustre l'évolution des poids corporels moyens (\pm ET) des rats des lots contrôles et des lots traités au fipronil pendant 28 jours.

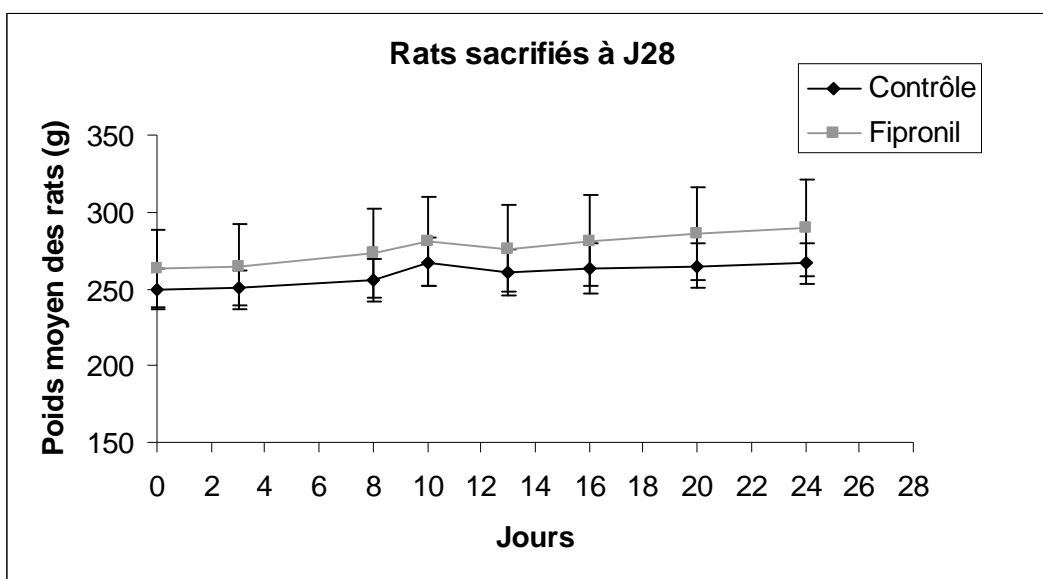


Figure 9 : Evolution des poids corporels moyens (\pm ET) des rats des lots contrôles et des lots traités pendant 28 jours. A partir de J0, les animaux ont reçu quotidiennement par VO une administration de fipronil (3 mg/kg/j) ou du milieu de suspension pendant une période de 28 jours, les pesées ont été bi-hebdomadaires.

L'examen visuel du graphique indique que le traitement n'a pas eu d'effet sur le poids moyen des animaux. Avant le début du traitement, les poids moyens des animaux des lots contrôles et traités étaient respectivement de 249.7 ± 12.9 g et 263.3 ± 25.24 g. A la fin du traitement, les poids moyens des animaux des lots contrôles et traités étaient respectivement de 266.4 ± 13.7 g et 289.1 ± 31.4 g.

3.3.2- Concentrations plasmatiques en T3 totale

La figure 10 illustre les concentrations plasmatiques moyennes (\pm ET) en T3 totale des lots de rats contrôles et traités au fipronil pendant 14 jours ou 28 jours.

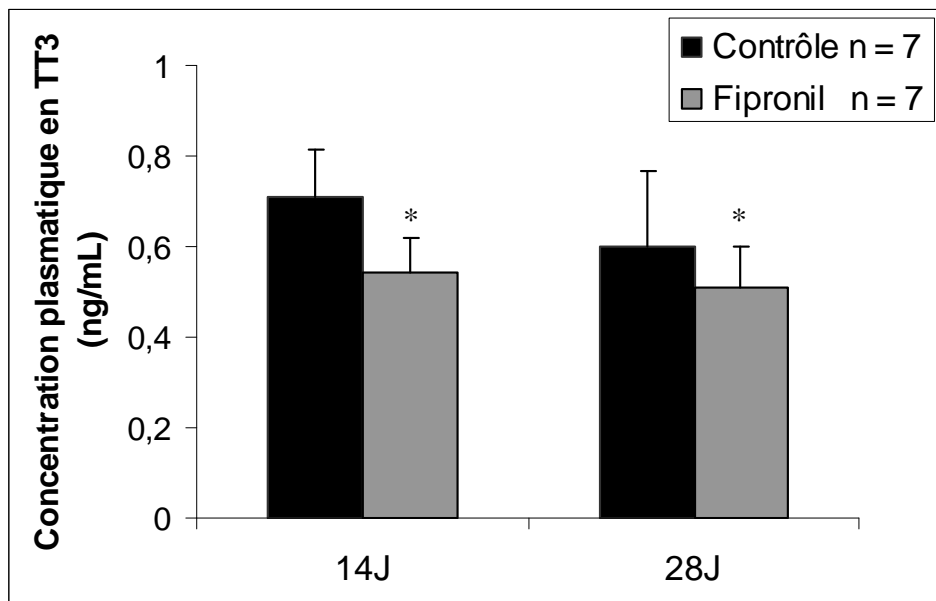


Figure 10 : Concentrations plasmatiques moyennes en T3 totale (\pm ET). Les concentrations plasmatiques en TT3 ont été évaluées chez des rats contrôles et chez des rats traités quotidiennement au fipronil par VO (3 mg/kg/j) pendant une période de 14 jours ou de 28 jours.

* $P < 0.05$ significativement différent du lot contrôle.

Il n'y a pas d'interaction entre la durée du traitement et le traitement. Le traitement au fipronil a diminué significativement les concentrations plasmatiques en T3 totale, cet effet est le même après 14 ou 28 jours de traitement. Il n'y a pas d'effet de la durée du traitement, donc les concentrations plasmatiques en T3 totale des rats des lots sacrifiés à J14 ne sont pas différentes de celles des rats sacrifiés à J28 (Tableau 3).

Pour des raisons techniques, les concentrations plasmatiques en T3 libre n'ont pas été évaluées.

3.3.3- Concentrations plasmatiques en T4 totale

La figure 11 illustre les concentrations plasmatiques moyennes (\pm ET) en T4 totale des lots de rats contrôles et traités au fipronil pendant 14 jours ou 28 jours.

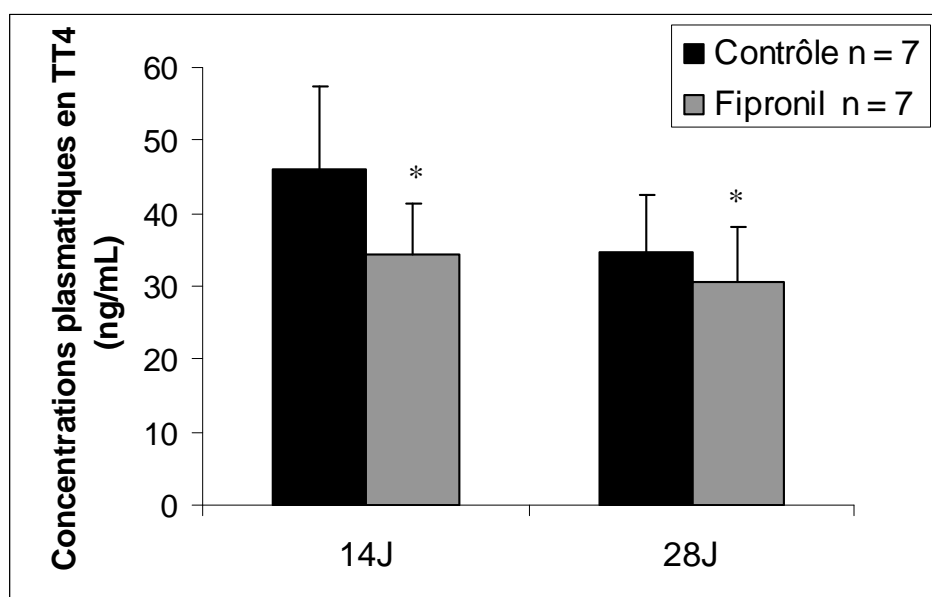


Figure 11 : Concentrations plasmatiques moyennes en T4 totale (\pm ET). Les concentrations plasmatiques en TT4 ont été évaluées chez des rats contrôles et chez des rats traités quotidiennement au fipronil par VO (3 mg/kg/j) pendant une période de 14 jours ou de 28 jours.

* P < 0.05 significativement différent du lot contrôle.

Il n'y a pas d'interaction entre la durée du traitement et le traitement. Le traitement au fipronil a diminué significativement les concentrations plasmatiques en T3 totale, cet effet est le même après 14 ou 28 jours de traitement. Il existe un effet de la durée du traitement, donc les concentrations plasmatiques en T3 totale des rats des lots sacrifiés à J14 sont significativement différentes de celles des rats sacrifiés à J28 (Tableau 3).

3.3.4- Concentrations plasmatiques en T4 libre

Pour des raisons techniques, seules les concentrations plasmatiques en T4 libre des lots de rats traités pendant 14 jours ont été évaluées.

La figure 12 illustre les concentrations plasmatiques moyennes en T4 libre (\pm ET) des lots de rats contrôles et traités pendant 14 jours.

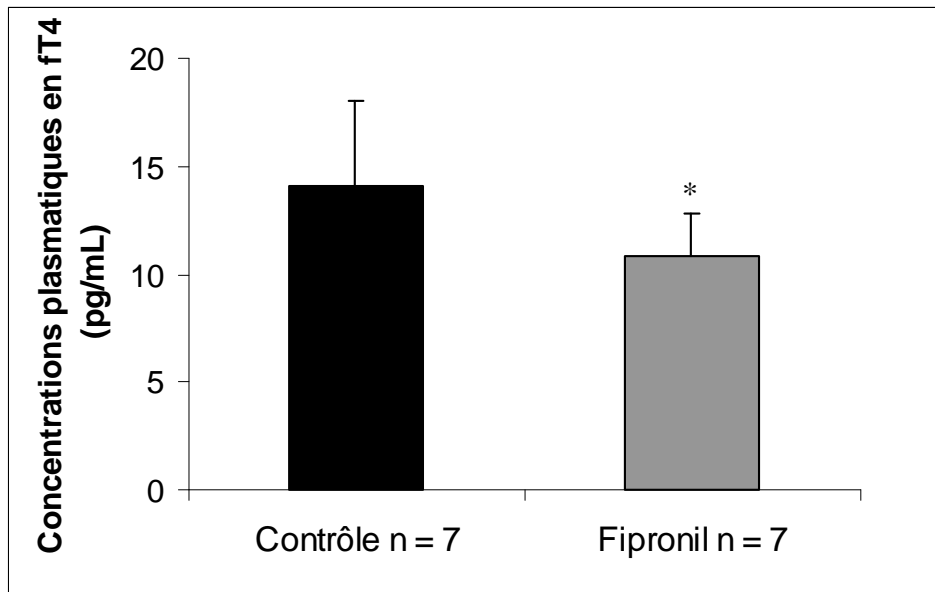


Figure 12 : Concentrations plasmatiques moyennes en T4 libre (\pm ET). Les concentrations plasmatiques en fT4 ont été évaluées chez des rats contrôles et chez des rats traités quotidiennement au fipronil par VO (3 mg/kg/j) pendant une période de 14 jours.
* P < 0.05 significativement différent du lot contrôle.

Les concentrations plasmatiques en fT4 des rats traités au fipronil sont significativement inférieures à celles des rats contrôles (Tableau 3).

3.3.5- Concentrations plasmatiques en TSH

La figure 13 illustre les concentrations plasmatiques moyennes en TSH (\pm ET) des lots de rats contrôles et traités au fipronil pendant 14 jours ou 28 jours.

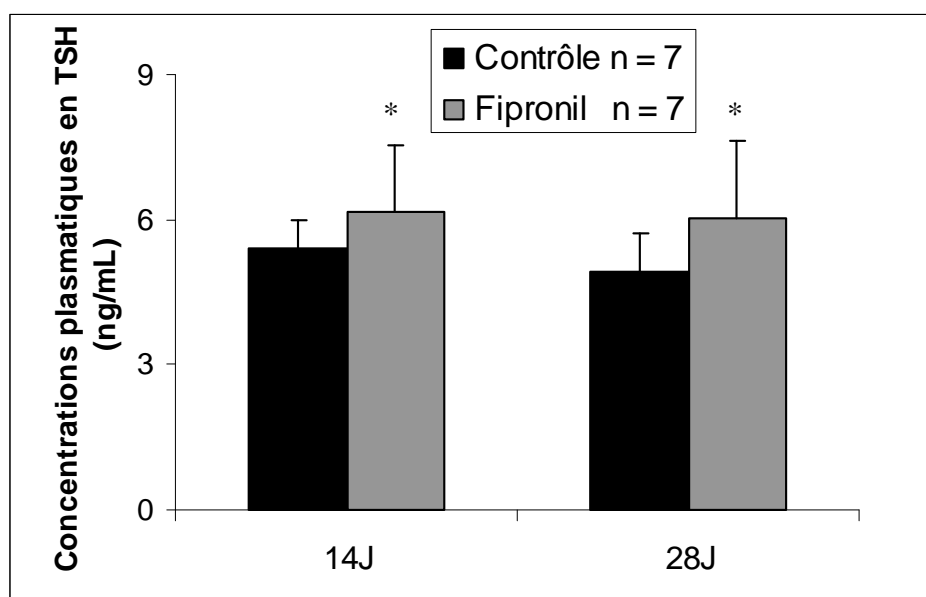


Figure 13 : Concentrations plasmatiques moyennes en TSH (\pm ET). Les concentrations plasmatiques en TSH ont été évaluées chez des rats contrôles et chez des rats traités quotidiennement au fipronil par VO (3 mg/kg/j) pendant une période de 14 ou de 28 jours. * P < 0.05 significativement différent du lot contrôle.

Il n'y a pas d'interaction entre la durée du traitement et le traitement. Le traitement au fipronil a augmenté significativement les concentrations plasmatiques en TSH, cet effet est le même après 14 ou 28 jours de traitement. Il n'y a pas d'effet de la durée du traitement, donc les concentrations plasmatiques en TSH des rats des lots sacrifiés à J14 ne sont pas différentes de celles des rats sacrifiés à J28 (Tableau 3).

	14 Jours		28 Jours	
	Contrôle	Fipronil	Contrôle	Fipronil
TT3 (ng/mL)	0.71 ± 0.11	0.55 ± 0.07 *	0.60 ± 0.16	0.51 ± 0.09 *
TT4 (ng/mL)	46.1 ± 11.3	34.4 ± 7.1 *	34.8 ± 7.69	30.5 ± 7.6 *
TSH (ng/mL)	5.40 ± 0.60	6.17 ± 1.36 *	4.94 ± 0.78	6.05 ± 1.57 *
ft4 (pg/mL)	14.0 ± 4.0	10.8 ± 2.0 *		
Fraction libre T4 (%)	0.03	0.03		

Tableau 3 : Effet du fipronil sur les concentrations en TT3, TT4, ft4 et TSH chez le rat. Les rats ont reçu quotidiennement par VO une administration de fipronil (3 mg/kg/j) ou du milieu de suspension, pendant une période de 14 jours ou de 28 jours. * P < 0.05 significativement différent du lot contrôle.

3.3.6- Concentrations plasmatiques en fipronil et en fipronil sulfone

Les concentrations en fipronil et en fipronil sulfone, son principal métabolite, ont été déterminées par méthode HPLC-UV chez les rats du lot traité pendant 28 jours (Tableau 4).

Numéro du rat	Fipronil (ng/mL)	Fipronil sulfone (ng/mL)
19	< LOQ	1214
20	< LOQ	3439
21	< LOQ	1727
22	< LOQ	2210
23	< LOQ	3397
24	< LOQ	2072

Tableau 4 : Concentrations plasmatiques en fipronil et en fipronil sulfone. Les rats ont reçu quotidiennement par VO une administration de fipronil (3 mg/kg/j), pendant une période de 28 jours.

Les concentrations plasmatiques moyennes (\pm ET) en fipronil sulfone (2343 ± 900 ng/mL) sont beaucoup plus élevées que les concentrations en fipronil, ces dernières étant inférieures à la limite de quantification du dosage (LOQ), celle-ci étant de 25 ng/mL.

4- EXPERIENCE 2 : EFFET DU FIPRONIL SUR LA CLAIRANCE DE LA T4 CHEZ LE RAT FEMELLE THYROÏDECTOMISE SUPPLEMENTE EN T3

4.1- OBJECTIF DE L'ETUDE

Cette étude a pour but d'évaluer l'effet du fipronil sur la clairance plasmatique de la T4 en utilisant le même traitement que celui qui nous a permis de mettre en évidence une perturbation de la fonction thyroïdienne (expérience 1).

Les études toxicologiques avaient montré un effet du fipronil sur la clairance de la T4 radiomarquée. Dans ces études, l'approche méthodologique avait consisté à évaluer la cinétique de décroissance de la radioactivité totale et ne permettait donc pas de distinguer la T4 de ses métabolites et de l'iode radioactive libre.

L'objectif de cette étude est de montrer que la perturbation thyroïdienne que nous avons mise en évidence (expérience 1) résulte d'une augmentation de la clairance de la T4 dans un modèle proche des conditions physiologiques, c'est-à-dire avec des rats femelles thyroïdectomisés traités à la T3 de manière à obtenir des concentrations plasmatiques physiologiques en T3.

4.2- MATERIEL ET METHODES

4.2.1- Animaux

Les rats femelles de race Wistar étaient âgés de 3 mois au moment de l'étude. Ils ont été thyroïdectomisés afin de s'affranchir de la production endogène de T4 et ont été supplémentés en T3 immédiatement après la thyroïdectomie de manière à obtenir un état "euthyroïdien" et d'inhiber l'expression de la TBG [59]. En effet, une étude a montré que la thyroïdectomie chez des rats adultes entraînait une réexpression de la TBG [63]. Vranckx et al. ont reproduit ces résultats et ont aussi montré qu'une administration quotidienne de T3 (12 µg/kg BW) par voie sous-cutanée permettait d'inhiber la réexpression de la TBG après la thyroïdectomie [59].

4.2.2- Méthodologie expérimentale

4.2.2.1- Plan expérimental (Figure 14)

Les 20 rats ont été répartis de façon aléatoire en 2 lots :

- 10 rats thyroïdectomisés et supplémentés en T3 traités au fipronil.
- 10 rats thyroïdectomisés et supplémentés en T3 contrôles.

A J0, les rats ont été thyroïdectomisés et les cathéters ont été mis en place dans la veine fémorale.

A J7, l'exposition au fipronil a débuté par VO à raison de 3 mg/kg/j. Les rats contrôles ont reçu une administration quotidienne du milieu de suspension.

A J21, la mesure de la clairance de la T4 a été réalisée pendant 48 heures chez tous les lots tout en maintenant le traitement des animaux (fipronil et T3).

A J23, les animaux ont été sacrifiés et le sang total a été récolté.

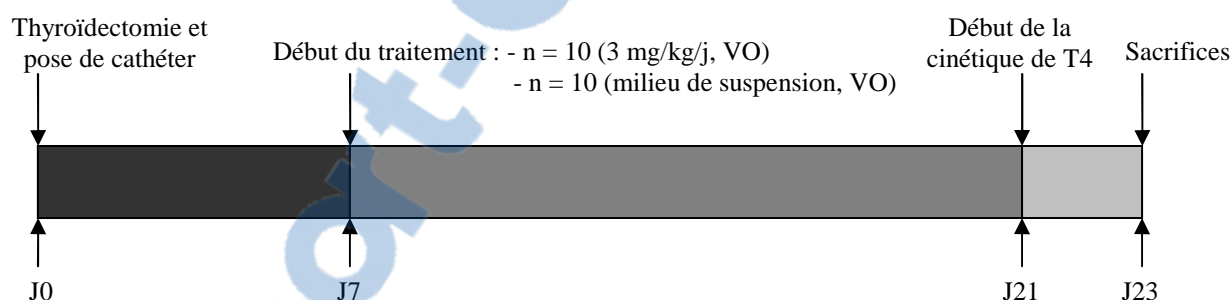


Figure 14 : Plan expérimental de l'expérience 2.

4.2.2.2- Modalités de traitement des animaux au fipronil

La suspension de fipronil à la concentration de 1.5 mg/mL a été agitée pendant 30 minutes avant les administrations et a été administrée quotidiennement par sondage gastro-œsophagien au début de la phase nocturne (10h00) à raison de 3 mg/kg/j. Les volumes à administrer ont été réévalués toutes les semaines en fonction du poids corporel et ont été prélevés sous agitation de la suspension. La même procédure a été utilisée pour calculer le volume du milieu de suspension de fipronil à administrer aux rats contrôles.

4.2.2.3- Modalités de traitement des animaux à la T3

La solution de T3 à la concentration de 10 µg/mL a été administrée quotidiennement par voie SC au début de la phase nocturne (10h00) à la dose de 12 µg/kg BW [59]. Le volume de T3 à injecter a été réévalué toutes les semaines en fonction du poids corporel.

4.2.2.4- Cinétique de T4

- Modalités d'administration de la T4 :

Une dose de T4 de 10 µg/kg BW a été administrée par voie IP à t = 0 min, au moyen de la solution de T4 à 10 µg/mL, en début de phase nocturne (10h00).

- Fréquence de collecte des échantillons :

L'évolution temporelle des concentrations plasmatiques en T4 a été suivie pendant 32 heures.

Un prélèvement de sang contrôle a été effectué la veille de l'administration. Des prélèvements de 200µL de sang ont été réalisés aux temps 0.25h, 1h, 2h, 4h, 8h, 24h et 32h après l'administration de T4.

Pour évaluer l'exposition au fipronil, le sang total a été collecté en fin d'étude.

- Modalités de collecte des échantillons :

- Prélèvements sanguins :

Pour prélever le sang, le cathéter a tout d'abord été purgé à travers la valve de manière à éliminer l'héparine. Un volume de 250 µL de sang a été prélevé dans un tube Eppendorf contenant 10 µL d'héparine diluée à 500 UI/mL. Le cathéter a ensuite été rincé avec un volume de 250 µL de sérum physiologique tiédi. Le cathéter a enfin été rempli avec un volume d'héparine diluée à 50 UI/mL égal au volume mort du cathéter (0.05 mL).

- Collecte de sang total :

Le sang total a été collecté *via* le cathéter sur héparinate de lithium chez le rat euthanasié avec 0.5 mL de pentobarbital (Doléthal®).

- Modalités de traitement des échantillons :

Pour la clairance de la T4, le sang a été centrifugé et un aliquot de plasma d'environ 100 µL a été conservé pour le dosage de la TT4 et de la FT4.

Le sang total a été centrifugé et quatre aliquots de 600µL de plasma ont été conservés pour le dosage du fipronil et du fipronil sulfone.

4.2.2.5- Analyse des données

- Analyse pharmacocinétique de la T4 :

Les paramètres pharmacocinétiques ont été évalués à l'aide d'une approche non compartimentale à l'aide du logiciel *WinNonLine® v.5.0.1*. Le paramètre de la clairance s'applique à tous les organes d'élimination. Si la clairance est déterminée à partir des concentrations plasmatiques, comme c'est généralement le cas, on parle de clairance plasmatique. Elle se définit comme le volume de plasma complètement épuré d'une substance par unité de temps (mL/min). L'excrétion d'une molécule hors de l'organisme peut se faire par plusieurs voies d'excrétion. Dans ce cas, la clairance totale est la somme des diverses clairances de chaque organe d'excrétion.

La clairance plasmatique (en mL/kg/min) est calculée selon l'équation 6 :

$$Cl = \frac{\text{Dose}}{AUC_{(0-t_{last})}} \quad \text{Equation 6}$$

Où Dose est la dose de T4 administrée à l'animal par voie IP en mg/kg.

$AUC_{(0-t_{last})}$ (ng.min/mL) est l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en T4 en fonction du temps, calculée en utilisant la méthode des trapèzes linéaires de $t = 0$ à $t = last$. t_{last} est le temps d'occurrence de la plus petite concentration d'hormone mesurable. L'aire sous la courbe $AUC_{(0-t_{last})}$ est calculée selon l'équation 7 :

$$AUC_{(0-t_{last})} = \frac{\sum_{i=0}^{i=last} (t_{i+1} - t_i) \times (C_i + C_{i+1})}{2} \quad \text{Equation 7}$$

Où C_i est la concentration observée au temps t_i .

Le temps moyen de résidence de la T4 (MRT, min) est déterminé selon l'équation 8 :

$$MRT = \frac{AUMC_{(0-t_{last})}}{AUC_{(0-t_{last})}} \quad \text{Equation 8}$$

Où l'AUMC (0-tlast) est l'aire sous la courbe du premier moment statistique définie selon l'équation 9 :

$$AUMC_{(0-tlast)} = \frac{\sum_{i=0}^{i=last} (t_{i+1} - t_i) \times (t_i \times C_i + t_{i+1} \times C_{i+1})}{2} \quad \text{Equation 9}$$

Le volume de distribution à l'équilibre (Vss, mL/kg) est déterminé selon l'équation 10 :

$$V_{ss} = Cl \times MRT \quad \text{Equation 10}$$

Où la clairance est déterminée par l'équation 6 et le MRT par l'équation 8.

Le temps de demi-vie ($t_{1/2}$, h) est déterminé selon l'équation 11 :

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2 \times V_{ss}}{Cl} \quad \text{Equation 11}$$

▪ Analyses statistiques :

Les paramètres pharmacocinétiques moyens des lots traités et contrôles ont été comparés à l'aide d'un test de Student non apparié.

4.3- RESULTATS

4.3.1- Suivi du poids des rats

Le traitement au fipronil n'a pas eu d'effet sur le poids corporel des rats femelles. En effet, au début du traitement, les poids moyens des rats des lots contrôle et traité ont été respectivement de 234 ± 15 g et 239 ± 19 g et à la fin du traitement, les poids moyens des rats des lots contrôle et traité ont été respectivement de 248 ± 16 g et 242 ± 17 g.

4.3.2- Clairance de T4 totale

La figure 15 illustre l'effet du fipronil sur l'évolution temporelle des concentrations plasmatiques moyennes (\pm ET) en T4 totale obtenues après l'administration par voie IP de T4 chez des rats contrôles et traités au fipronil.

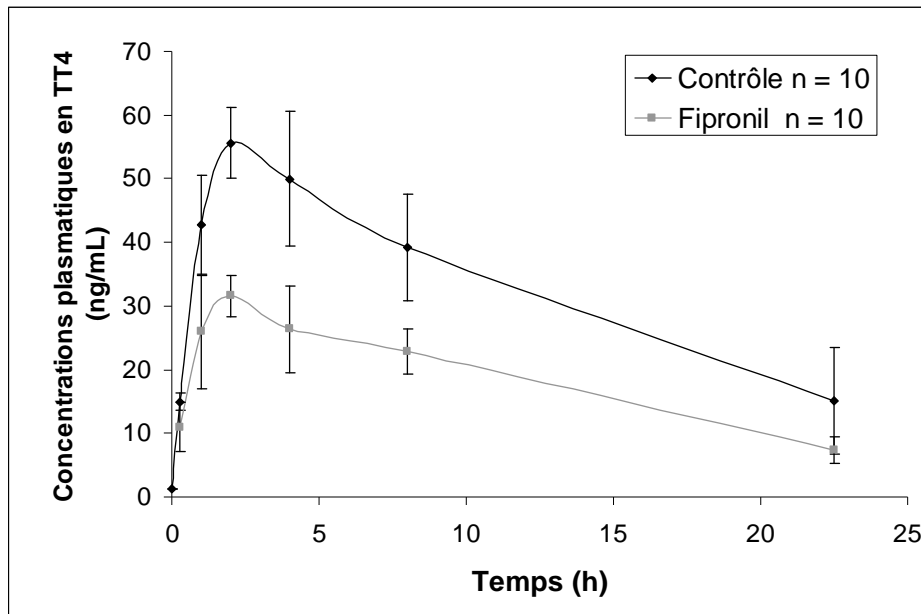


Figure 15 : Effet du fipronil sur l'évolution temporelle des concentrations plasmatiques moyennes en TT4 (\pm ET) après une administration de T4 par voie IP chez des rats thyroïdectomisés et supplémentés en T3. Les rats thyroïdectomisés traités quotidiennement par voie SC avec de la T3 (12 μ g/kg/j) ont reçu une administration quotidienne par VO de fipronil (3 mg/kg/j) (lot traité au fipronil) ou de milieu de suspension (lot contrôle) pendant une période de 14 jours. Le jour suivant la dernière administration, les concentrations en T4 totale ont été suivies après une administration unique de T4 par voie IP (10 μ g/kg).

La figure 16 illustre l'effet du fipronil sur la clairance moyenne (\pm ET) en T4 totale évaluée après l'administration par voie IP de T4 chez des rats contrôles et traités au fipronil.

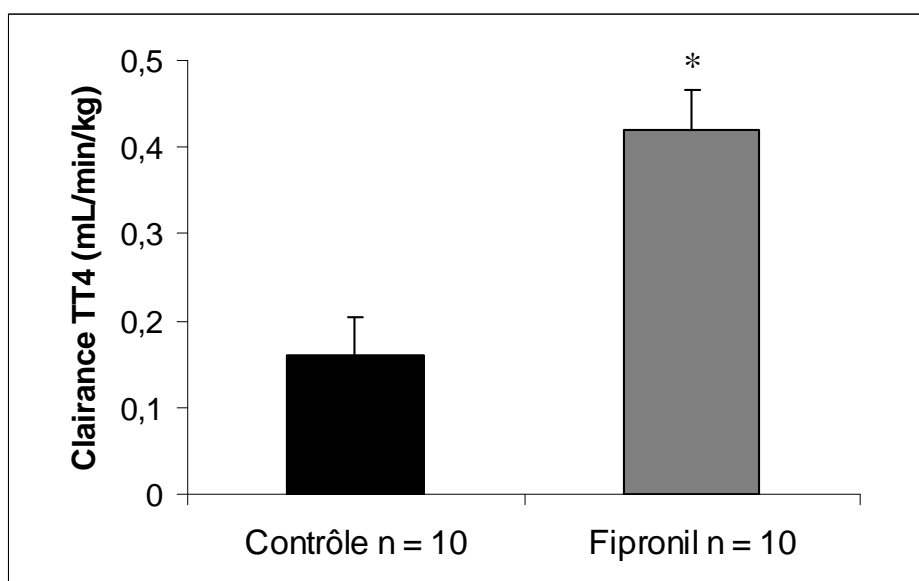


Figure 16 : Effet du fipronil sur la clairance moyenne de TT4 (\pm ET) après une administration de T4 par voie IP chez des rats thyroïdectomisés et supplémentés en T3.

Les rats thyroïdectomisés traités quotidiennement par voie SC avec de la T3 (12 μ g/kg/j) ont reçu une administration quotidienne par VO de fipronil (3 mg/kg/j) (lot traité au fipronil) ou de milieu de suspension (lot contrôle) pendant une période de 14 jours. Le jour suivant la dernière administration, les concentrations en T4 totale ont été suivies après une administration unique de T4 par voie IP (10 μ g/kg).

* P < 0.01 significativement différent du lot contrôle.

La clairance de TT4 des rats traités au fipronil est significativement supérieure à celle des rats contrôles (Tableau 5).

Le tableau 5 illustre l'effet du fipronil sur les paramètres pharmacocinétiques moyens (\pm ET) de la T4 totale et libre après l'administration par voie IP de T4 chez des rats contrôles et traités au fipronil.

T4 Totale		
	Contrôle	Fipronil
AUC (ng.h/mL)	852 ± 143	372 ± 147 **
Clairance (mL/min/kg)	0.16 ± 0.04	0.42 ± 0.02 **
Temps de demi-vie (h)	11.8 ± 2.6	7.9 ± 2.6 *
Cmax (ng/mL)	58.8 ± 6.9	31.8 ± 4.2 **
Tmax (h)	2.7 ± 1.2	2.6 ± 1.2
Vss (mL/kg)	163.4 ± 19.0	287.2 ± 58.2 **

Tableau 5 : Effet du fipronil sur les paramètres pharmacocinétiques moyens de la TT4 (±ET) après une injection IP de T4 chez des rats thyroïdectomisés et supplémentés en T3. Les rats thyroïdectomisés traités quotidiennement par voie SC avec de la T3 (12 µg/kg/j) ont reçu une administration quotidienne par VO de fipronil (3 mg/kg/j) (lot traité au fipronil) ou de milieu de suspension (lot contrôle) pendant une période de 14 jours. Le jour suivant la dernière administration, les concentrations en T4 totale ont été suivies après une administration unique de T4 par voie IP (10 µg/kg). Les paramètres pharmacocinétiques sont calculés avec un modèle non compartimental pour chaque animal.

* P < 0.05 significativement différent du groupe contrôle.

** P < 0.01 significativement différent du groupe contrôle.

L'AUC, le temps de demi-vie et la concentration maximale en TT4 des rats traités au fipronil sont significativement inférieurs à ceux des rats contrôles. Le volume de distribution de la TT4 des rats traités au fipronil est significativement supérieur à celui des rats contrôles. Le fipronil n'a pas eu d'effet significatif sur le Tmax (Tableau 5).

4.3.3- Clairance de T4 libre

La figure 17 illustre l'effet du fipronil sur l'évolution temporelle des concentrations plasmatiques moyennes (± ET) en T4 libre obtenue après l'administration par voie IP de T4 chez des rats contrôles et traités au fipronil.

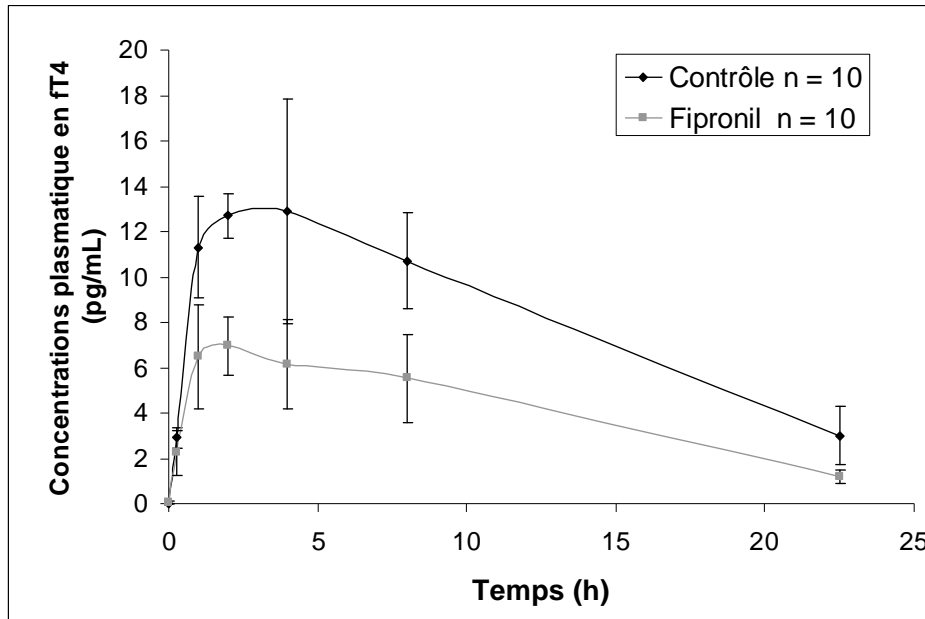


Figure 17 : Effet du fipronil sur l'évolution temporelle des concentrations plasmatiques moyennes en fT4 (\pm ET) après une administration de T4 par voie IP chez des rats thyroïdectomisés et supplémentés en T3. Les rats thyroïdectomisés traités quotidiennement par voie SC avec de la T3 (12 μ g/kg/j) ont reçu une administration quotidienne par VO de fipronil (3 mg/kg/j) (lot traité au fipronil) ou de milieu de suspension (lot contrôle) pendant une période de 14 jours. Le jour suivant la dernière administration, les concentrations en T4 libre ont été suivies après une administration unique de T4 par voie IP (10 μ g/kg).

La figure 18 illustre l'effet du fipronil sur la clairance moyenne (\pm ET) en T4 libre, évaluée après l'administration par voie IP de T4, chez des rats contrôles et traités au fipronil.

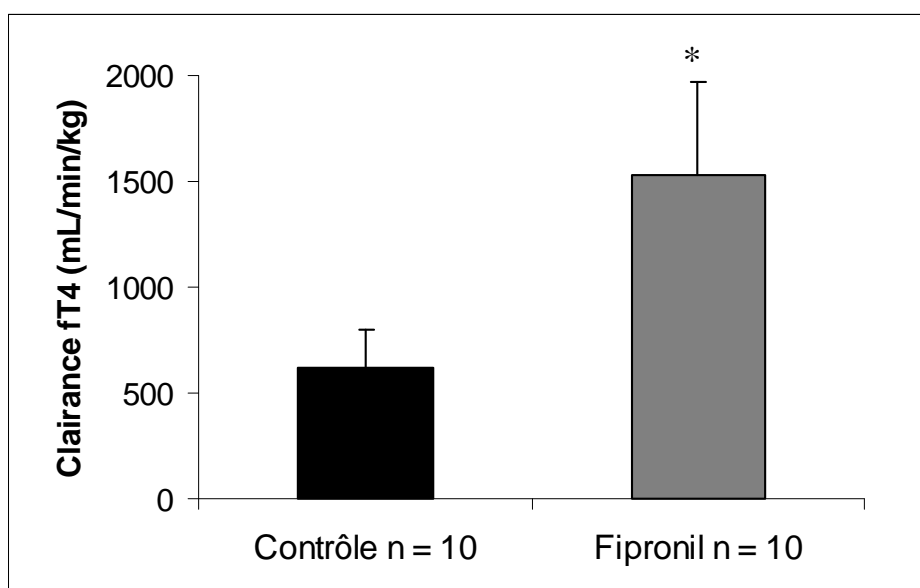


Figure 18 : Effet du fipronil sur la clairance moyenne de fT4 (\pm ET) après une administration de T4 par voie IP chez des rats thyroïdectomisés et supplémentés en T3. Les rats thyroïdectomisés traités quotidiennement par voie SC avec de la T3 (12 μ g/kg/j) ont reçu une administration quotidienne par VO de fipronil (3 mg/kg/j) (lot traité au fipronil) ou de milieu de suspension (lot contrôle) pendant une période de 14 jours. Le jour suivant la dernière administration, les concentrations en T4 libre ont été suivies après une administration unique de T4 par voie IP (10 μ g/kg).

* P < 0.01 significativement différent du lot contrôle

La clairance de fT4 des rats traités au fipronil est significativement supérieure à celle des rats contrôles (Tableau 6).

Le tableau 6 illustre l'effet du fipronil sur les paramètres pharmacocinétiques moyens (\pm ET) de la T4 libre après l'administration par voie IP de T4 chez des rats contrôles et traités au fipronil.

T4 libre		
	Contrôle	Fipronil
AUC (pg.h/mL)	231 ± 58	94 ± 45 **
Clairance (mL/min/kg)	622 ± 174	1531 ± 438 **
Temps de demi-vie (h)	10.2 ± 2.0	8.0 ± 1.9 *
Cmax (pg/mL)	17.1 ± 3.4	9.0 ± 2.4**
Tmax (h)	2.2 ± 1.0	2.6 ± 1.4
Vss (L/kg)	549 ± 64	1060 ± 215 **

Tableau 6 : Effet du fipronil sur les paramètres pharmacocinétiques moyens de la fT4 (± ET) après une injection IP de T4 chez des rats thyroïdectomisés et supplémentés en T3.

Les rats thyroïdectomisés traités quotidiennement par voie SC avec de la T3 (12 µg/kg/j) ont reçu une administration quotidienne par VO de fipronil (3 mg/kg/j) (lot traité au fipronil) ou de milieu de suspension (lot contrôle) pendant une période de 14 jours. Le jour suivant la dernière administration, les concentrations en T4 libre ont été suivies après une administration unique de T4 par voie IP (10 µg/kg). Les paramètres pharmacocinétiques sont calculés avec un modèle non compartimental pour chaque animal.

* P < 0.05 significativement différent du groupe contrôle.

** P < 0.01 significativement différent du groupe contrôle.

L'AUC, le temps de demi-vie et la concentration maximale en fT4 des rats traités au fipronil sont significativement inférieurs à ceux des rats contrôles. Le volume de distribution de la fT4 des rats traités au fipronil est significativement supérieur à celui des rats contrôles. Le fipronil n'a pas eu d'effet significatif sur le Tmax (Tableau 6).

5- ESSAI PILOTE : EFFET DU FIPRONIL ET D'UNE SUPPLEMENTATION EN T3 SUR LA CLAIRANCE DE LA T4 CHEZ LE RAT FEMELLE THYROÏDECTOMISE

5.1- OBJECTIF DE L'ESSAI

L'objectif de l'essai pilote est d'évaluer l'influence de la TBG sur le potentiel perturbateur thyroïdien du fipronil. Pour cela, nous avons comparé la clairance de la T4 de rats exprimant la TBG (thyroïdectomisés) et de rats n'exprimant pas la TBG (thyroïdectomisés et supplémentés en T3). En effet, les études montrent que la thyroïdectomie induit une réexpression de la TBG [63], cette expression pouvant être inhibée par une supplémentation en T3 [59].

L'hypothèse classiquement admise est que la TBG protégerait les hormones thyroïdiennes du catabolisme hépatique et qu'elle rendrait les individus moins sensibles aux effets perturbateurs thyroïdiens du fipronil.

5.2- MATERIEL ET METHODES

5.2.1- Animaux

Cet essai pilote a été réalisé sur des rats femelles de race Wistar âgés de 2 mois au moment de la thyroïdectomie. Ils ont été répartis au hasard en 4 lots :

- 1^{er} lot : rats thyroïdectomisés, supplémentés en T3 (TBG⁻) et traités au fipronil.
- 2^{ème} lot : rats thyroïdectomisés, supplémentés en T3 (TBG⁻) contrôles.
- 3^{ème} lot : rats thyroïdectomisés (TBG⁺) et traités au fipronil.
- 4^{ème} lot : rats thyroïdectomisés (TBG⁺) contrôles.

Des résultats ont été obtenus seulement sur 2 animaux pour le 1^{er} et le 2^{ème} lot et sur 1 animal pour les 3^{ème} et 4^{ème} lots.

5.2.2- Méthodologie expérimentale

5.2.2.1- Plan expérimental (Figure 19)

Tous les rats ont été thyroïdectomisés puis dès le lendemain, les rats des lots (TBG⁻) ont reçu une injection quotidienne de T3 (6 µg/kg/j, SC).

A J0, l'exposition au fipronil a débuté par VO à raison de 1.5 mg/kg/j. Les rats contrôles ont reçu une administration quotidienne du milieu de suspension.

A J15, les cathéters ont été mis en place dans la veine fémorale.

A J17, la mesure de la clairance de la T4 a été réalisée pendant 5 jours chez tous les rats tout en maintenant le traitement des animaux (fipronil et T3).

A J22, les animaux ont été sacrifiés et le sang total a été récolté.

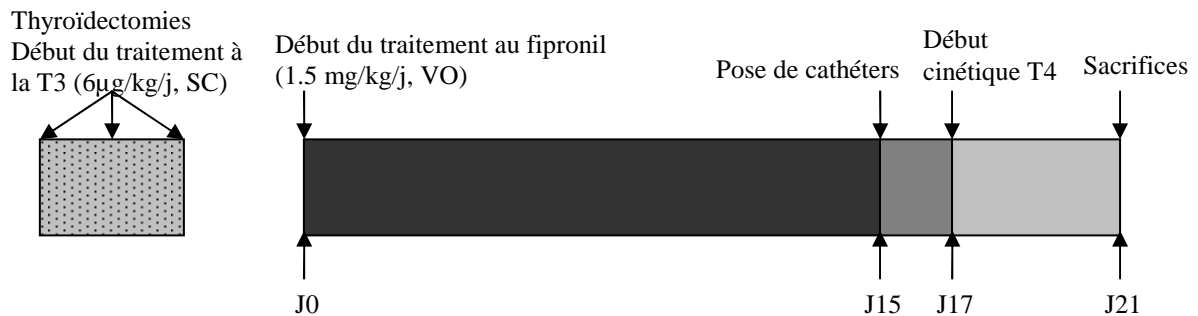


Figure 19 : Plan expérimental de l'essai pilote.

5.2.2.2- Modalités de traitement des animaux au fipronil

La suspension de fipronil à la concentration de 0.75 mg/mL a été agitée pendant 30 minutes avant les administrations et a été administrée quotidiennement par sondage gastro-œsophagien au début de la phase nocturne (10h00) à raison de 1.5 mg/kg/j. Les volumes à administrer réévalués toutes les semaines en fonction du poids corporel ont été prélevés sous agitation de la suspension. La même procédure a été utilisée pour calculer le volume du milieu de suspension de fipronil à administrer aux rats contrôles.

5.2.2.3- Modalités de traitement des animaux à la T3

La solution de T3 à la concentration de 10 µg/mL a été administrée quotidiennement par voie SC au début de la phase nocturne (10h00) à la dose quotidienne de 6 µg/kg BW. Le volume de T3 à injecter a été réévalué en fonction du poids corporel toutes les semaines.

5.2.2.4- Evolution du protocole au cours de l'étude

La dose initiale de fipronil était de 10 mg/kg et les rats des lots (TBG⁻) recevaient une dose quotidienne de T3 de 12 µg/kg [59]. Plusieurs rats traités au fipronil et à la T3 ayant manifesté des signes cliniques de toxicité (convulsions, hyperexcitabilité, trémulations), il a été décidé de diminuer les doses de T3 à 6 µg/kg/j et les doses de fipronil à 1.5 mg/kg/j. A cette dose, les études toxicologiques [54] avaient montré un effet du fipronil sur la sécrétion de TSH.

5.2.2.5- Cinétique de T4

La cinétique de T4 a été réalisée en utilisant le même protocole que celui de l'expérience 2, à l'exception de la voie d'administration et de la dose de T4. La T4 a été administrée par voie IV à la dose de 12 µg/kg BW.

La décroissance des concentrations plasmatiques en T4 a été suivie sur 5 jours. Des prélèvements de 250 µL de sang ont été réalisés avant l'administration de T4 puis aux temps 0.25h, 0.5h, 1h, 2h, 4h, 8h, 12h, 24h après l'administration de T4 puis une fois par jour jusqu'à J5 post administration.

Pour évaluer l'exposition au fipronil et au fipronil sulfone, le sang total a été collecté par ponction de l'aorte abdominale après anesthésie générale grâce à une administration par voie IP d'un mélange anesthésique composé de médétomidine (Domitor®) et de kétamine (Imalgène® 1000). Les posologies des anesthésiques sont de 0.2 mg/kg BW de médétomidine et de 40 mg/kg BW de kétamine.

5.3- RESULTATS

5.3.1- Suivi du poids des rats

La figure 20 illustre l'évolution au cours du temps du poids moyen (\pm ET) des rats des lots contrôles.

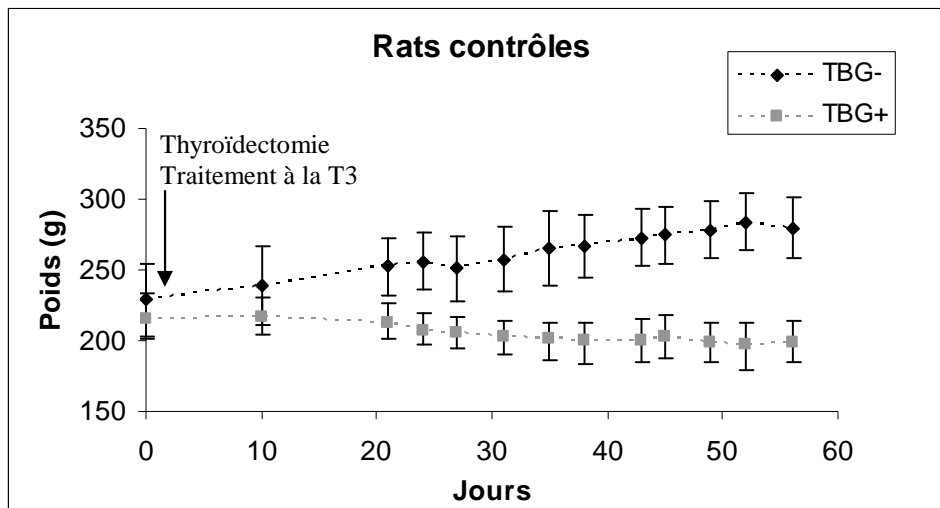


Figure 20 : Evolution des poids corporels moyens (\pm ET) des rats des lots contrôles. Les rats thyroïdectomisés ont reçu quotidiennement par voie SC une administration de T3 (12 μ g/kg/j de J2 à J40 puis 6 μ g/kg/j de J41 à J56) (lot TBG⁻) ou de solvant (lot TBG⁺) et une administration quotidienne par VO de milieu de suspension pendant une période de 14 jours, les pesées ont été bi-hebdomadaires.

Avant le début du traitement, le poids moyen des animaux des lots (TBG⁻) et (TBG⁺) était de 228.6 ± 26.0 g et 215.0 ± 18.5 g respectivement. L'examen visuel de la figure 20 montre que le poids moyen des animaux thyroïdectomisés et traités à la T3 (TBG⁻) a augmenté alors que celui des animaux thyroïdectomisés (TBG⁺) a diminué au cours du temps.

La figure 21 illustre l'évolution au cours du temps du poids moyen (\pm ET) des rats des lots traités.

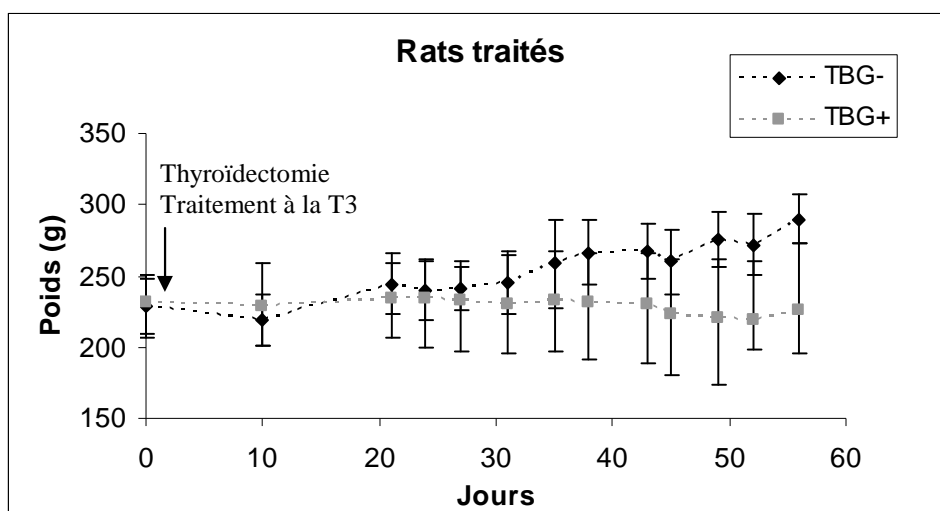


Figure 21 : Evolution des poids corporels moyens (\pm ET) des rats des lots traités. Les rats thyroïdectomisés ont reçu quotidiennement par voie SC une administration de T3 ($12 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$ de J2 à J40 puis $6 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$ de J41 à J56) (lot TBG⁻) ou de solvant (lot TBG⁺) et une administration quotidienne par VO de fipronil ($10 \text{ mg}/\text{kg}/\text{j}$ de J37 à J40 puis $1.5 \text{ mg}/\text{kg}/\text{j}$ de J41 à J56) pendant une période de 14 jours, les pesées ont été bi-hebdomadaires.

Avant le début du traitement, le poids moyen des animaux des lots (TBG⁻) et (TBG⁺) était de $228.6 \pm 19.6 \text{ g}$ et $230.7 \pm 19.9 \text{ g}$ respectivement. L'examen visuel de la figure 21 indique que le poids moyen des animaux thyroïdectomisés et traités à la T3 (TBG⁻) a augmenté alors que celui des animaux thyroïdectomisés (TBG⁺) a diminué au cours du temps.

5.3.2- Clairance de la T4 totale

La figure 22 compare la cinétique de décroissance des concentrations plasmatiques en TT4 après une administration de T4 par voie IV chez des rats contrôles et thyroïdectomisés (lot TBG⁺) et des rats contrôles, thyroïdectomisés et traités à la T3 (lot TBG⁻).

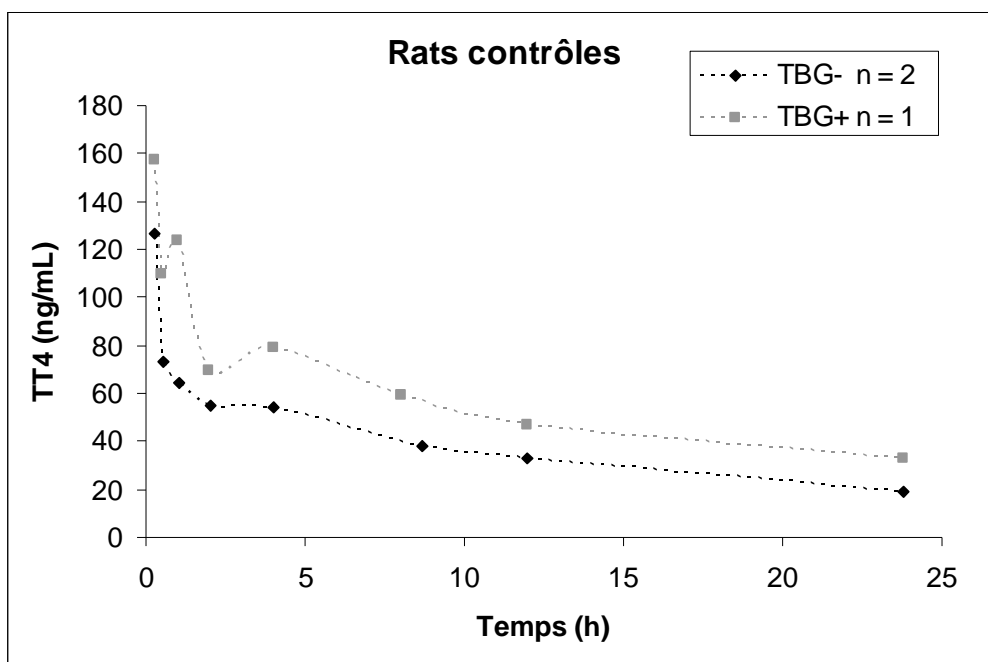


Figure 22 : Cinétique de décroissance des concentrations plasmatiques moyennes en TT4 chez des rats des lots (TBG⁻) et (TBG⁺) contrôles après une administration de T4 par voie IV. Les rats thyroïdectomisés ont reçu quotidiennement par voie SC une administration de T3 (12 µg/kg/j de J2 à J40 puis 6 µg/kg/j de J41 à J56) (lot TBG⁻) ou de solvant (lot TBG⁺). Ils ont reçu une administration quotidienne de milieu de suspension par VO pendant une période de 14 jours. Le jour suivant la dernière administration, les concentrations en T4 totale ont été suivies après une administration unique de T4 par voie IV (12 µg/kg).

La figure 23 compare la cinétique de décroissance des concentrations plasmatiques en TT4 après une administration de T4 par voie IV chez le rat traité au fipronil et thyroïdectomisé (lot TBG⁺) et les deux rats traités au fipronil, thyroïdectomisés et traités à la T3 (lot TBG⁻).

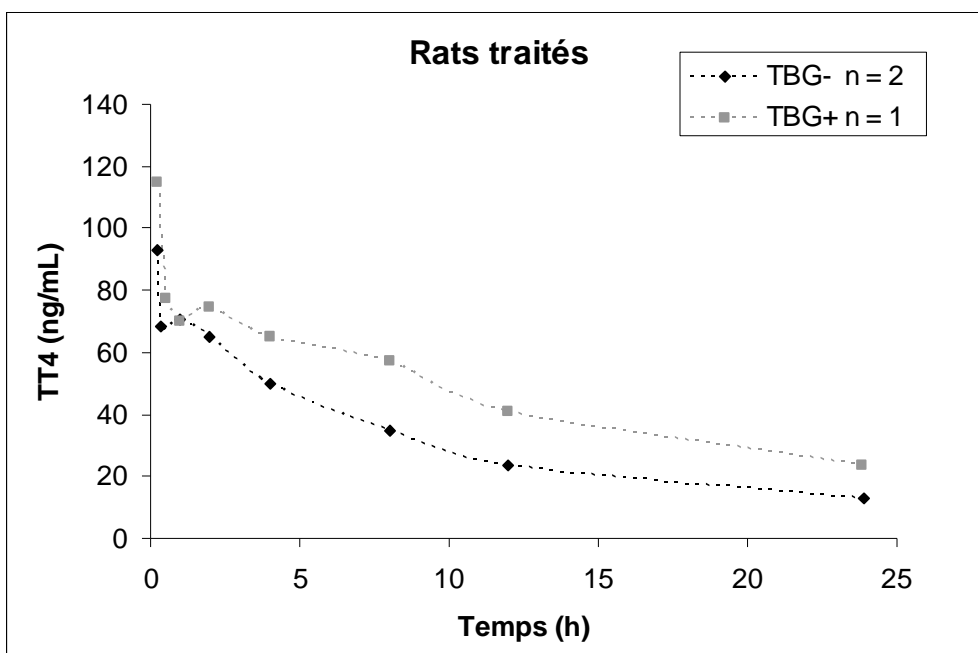


Figure 23 : Cinétique de décroissance des concentrations plasmatiques moyennes en TT4 chez des rats des lots (TBG⁻) et (TBG⁺) traités au fipronil après une administration de T4 par voie IV. Les rats thyroïdectomisés ont reçu quotidiennement par voie SC une administration de T3 (12 µg/kg/j de J2 à J40 puis 6 µg/kg/j de J41 à J56) (lot TBG⁻) ou de solvant (lot TBG⁺). Ils ont reçu une administration quotidienne de fipronil par VO (10 mg/kg/j de J37 à J40 puis 1.5 mg/kg/j de J41 à J56) pendant une période de 14 jours. Le jour suivant la dernière administration, les concentrations en T4 totale ont été suivies après une administration unique de T4 par voie IV (12 µg/kg).

La figure 24 illustre l'effet du fipronil sur la clairance de la TT4 chez les rats thyroïdectomisés (lots TBG⁺) et les rats thyroïdectomisés traités à la T3 (lots TBG⁻) après l'administration par voie IV de T4.

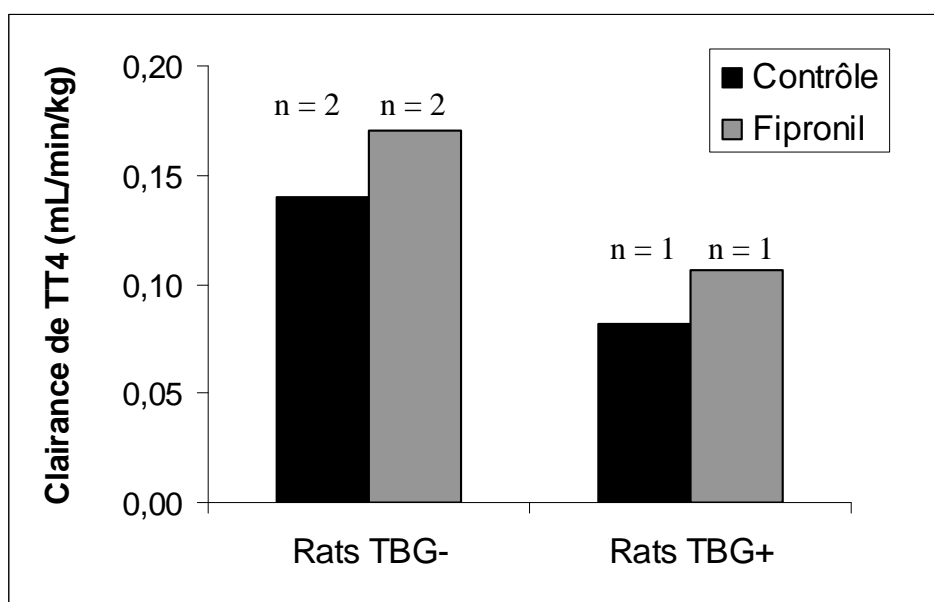


Figure 24 : Effet du fipronil sur la clairance de la TT4 chez les rats thyroïdectomisés (lots TBG⁺) et les rats thyroïdectomisés traités à la T3 (lots TBG⁻) après l'administration par voie IV de T4. Les rats ont reçu quotidiennement par voie SC une administration de T3 (12 µg/kg/j de J2 à J40 puis 6 µg/kg/j de J41 à J56) (lots TBG⁻) ou de solvant (lot TBG⁺). Ils ont reçu une administration quotidienne de fipronil par VO (10 mg/kg/j de J37 à J40 puis 1.5 mg/kg/j de J41 à J56) ou de milieu de suspension pendant une période de 14 jours. Le jour suivant la dernière administration, les concentrations en T4 totale ont été suivies après une administration unique de T4 par voie IV (12 µg/kg).

La clairance de la TT4 semble diminuée chez les rats des lots (TBG⁺) par rapport à celle des rats des lots (TBG⁻). La clairance de la TT4 ne semble pas modifiée chez les rats contrôles par rapport à celle des rats des lots traités (Tableau 6).

Le faible nombre d'animaux ne permet cependant pas de conclure.

Le tableau 7 illustre l'effet du fipronil sur les paramètres pharmacocinétiques de la TT4 chez les rats thyroïdectomisés (lots TBG⁺) et les rats thyroïdectomisés traités à la T3 (lots TBG⁻) après l'administration par voie IV de T4.

	Contrôle		Fipronil	
	TBG ⁺ (n = 1)	TBG ⁻ (n = 2)	TBG ⁺ (n = 1)	TBG ⁻ (n = 2)
AUC (ng.h/mL)	1349	1041	1129	991
Clairance (mL/min/kg)	0.08	0.14	0.11	0.17
Temps de demi-vie (h)	14.4	8.51	13.0	10.7
Cmax (ng/mL)	157	126	114	92.9
T max (h)	0.27	0.25	0.25	0.25
Vss (mL/kg)	103	121	117.05	130

Tableau 7 : Effet du fipronil sur les paramètres pharmacocinétiques de la TT4 chez les rats thyroïdectomisés (lots TBG⁺) et les rats thyroïdectomisés traités à la T3 (lots TBG⁻) après une administration unique de T4 par voie IV chez le rat. Les rats thyroïdectomisés ont reçu quotidiennement par voie SC une administration de T3 (12µg/kg/j de J2 à J40 puis 6µg/kg/j de J41 à J56) (lots TBG⁻) ou de solvant (lot TBG⁺). Ils ont reçu une administration quotidienne par VO de fipronil (10 mg/kg/j de J37 à J40 puis 1.5 mg/kg/j de J41 à J56) ou de milieu de suspension pendant une période de 14 jours. Le jour suivant la dernière administration, les concentrations en T4 totale ont été suivies après une injection unique de T4 (12 µg/kg) par voie IV. Les paramètres pharmacocinétiques ont été calculés avec un modèle non compartimental pour chaque animal.

Il semble que le traitement au fipronil n'a pas eu d'effet sur les paramètres pharmacocinétiques. Les paramètres pharmacocinétiques des rats des lots (TBG⁺) sont différents des lots (TBG⁻). En effet, l'AUC, le temps de demi-vie et la concentration maximale des rats des lots (TBG⁻) sont inférieurs à ceux des rats des lots (TBG⁺). Le volume de distribution des rats des lots (TBG⁻) est supérieur à celui des rats des lots (TBG⁺).

TROISIEME PARTIE : DISCUSSION

Les objectifs de cette étude étaient de valider le schéma physiopathologique hypothétique du fipronil sur la fonction thyroïdienne chez le rat et d'analyser l'effet de l'expression de la TBG sur la clairance de la thyroxine chez le rat.

Pour cela nous avons étudié dans un premier temps les effets d'un traitement au fipronil par voie orale, à la dose quotidienne de 3 mg/kg durant une période de 14 jours ou de 28 jours, sur les concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes et en TSH. Les valeurs des concentrations plasmatiques en T3 totale et en T4 totale des rats contrôles sont compatibles avec les valeurs observées dans d'autres études [56]. Le traitement au fipronil d'une durée de 14 ou 28 jours a diminué les concentrations plasmatiques en T3 totale, en T4 totale et augmenté les concentrations plasmatiques en TSH. Le traitement quotidien au fipronil à la dose de 3 mg/kg/j par voie orale provoque donc une perturbation de la fonction thyroïdienne reflétée par une augmentation des concentrations plasmatiques en TSH et une diminution des concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes. Ces résultats suggèrent que les concentrations en TSH sont augmentées en réponse à la diminution du rétrocontrôle négatif associée à la diminution des concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes.

Dans un second temps, nous avons examiné l'hypothèse selon laquelle la diminution des concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes résulte d'une augmentation de la clairance des hormones thyroïdiennes par le fipronil. Pour cela, nous avons développé un modèle physiologique chez le rat : le rat thyroïdectomisé traité à la T3. Ce modèle a été développé afin de supprimer la sécrétion endogène des hormones thyroïdiennes et d'inhiber l'expression de la TBG normalement réexprimée chez le rat thyroïdectomisé [59]. Les résultats de cette seconde expérience montrent que le fipronil augmente la clairance de la T4 totale ainsi que la clairance de la T4 libre. La clairance de la T4 totale des rats non traités observée dans notre expérience est cohérente avec les valeurs de clairance de la T4 observées dans d'autres études [34, 60, 62]. Nous pouvons en conclure que notre modèle est proche des conditions physiologiques et que la dose de T3 administrée quotidiennement permet d'atteindre un état euthyroïdien. Le traitement au fipronil n'a pas eu d'effet sur l'absorption de la T4 puisque le temps d'occurrence de la concentration maximale (Tmax) reste inchangé.

Ces résultats nous permettent de valider le schéma physiopathologique hypothétique du fipronil sur la fonction thyroïdienne. La diminution des concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes qui résulte de l'augmentation de la clairance des hormones

thyroïdiennes expliquerait l'augmentation des concentrations en TSH par une diminution du rétrocontrôle négatif. L'activation de la croissance de la glande thyroïdienne par une sécrétion excessive et soutenue en TSH potentialiserait des processus de carcinogenèse thyroïdienne. L'augmentation de la clairance des hormones thyroïdiennes par le fipronil pourrait résulter d'une activation des enzymes hépatiques du métabolisme des hormones thyroïdiennes. En accord avec cette hypothèse, des travaux réalisés *in vitro* sur des systèmes microsomaux hépatiques, notamment CYP3A4 et CYP2C19, montrent que le fipronil augmenterait la métabolisation des hormones thyroïdiennes [51]. Pour vérifier le rôle inducteur du fipronil sur les enzymes du métabolisme des hormones thyroïdiennes *in vivo*, il serait intéressant d'évaluer l'effet du fipronil sur un substrat des cytochromes P450 hépatiques comme l'antipyrine. En effet, l'antipyrine est largement utilisée pour tester l'activité des enzymes de phase 1 car c'est un substrat non spécifique des cytochromes P450 [2], enzymes impliquées dans le catabolisme des hormones thyroïdiennes. Une autre voie d'action est connue pour des molécules perturbatrices thyroïdiennes telles que les PCB mais elle n'est pas explorée pour le fipronil. Ces molécules induiraient des UGT (Uridine-Glucuronosyltransférases) qui sont des enzymes hépatiques clés dans le métabolisme des hormones thyroïdiennes. L'activation des T4-UGT et des T3-UGT suffirait à produire une diminution des concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes nécessaire pour entraîner l'élévation des taux de TSH [57].

Le schéma physiopathologique proposé par les industriels pour expliquer l'effet du fipronil sur la fonction thyroïdienne chez le rat est invalidé pour l'homme en raison de l'absence de TBG chez le rat et est présenté à ce titre comme une particularité d'espèce. L'hypothèse mise en avant est que la TBG protégerait les hormones thyroïdiennes du catabolisme hépatique et que le fipronil n'aurait pas d'effet sur la clairance de la T4 chez les espèces exprimant la TBG. En accord avec cette hypothèse, une expérience a été mise en œuvre au laboratoire pour étudier l'effet du fipronil sur la clairance de la T4 chez la brebis (données non publiées). Les résultats n'ont montré aucun effet du fipronil sur ce paramètre. La brebis apparaît alors comme étant un modèle d'étude de la fonction thyroïdienne chez l'homme plus pertinent que le rat puisque celui-ci possède la TBG, contrairement au rat adulte [44]. Pour répondre à la question de l'importance de la TBG dans la pertinence des modèles animaux utilisés dans les études toxicologiques et pour valider notre hypothèse, il serait pertinent d'évaluer la clairance de la T4 chez le rat exprimant ou non la TBG. C'est la raison pour laquelle un essai pilote a été réalisé afin d'évaluer l'influence de la TBG sur l'effet perturbateur de la fonction thyroïdienne du fipronil. Les résultats de cet essai pilote ont été obtenus sur un petit nombre d'animaux (1 à

2 par lots) ne permettant pas de conclure. En effet, nous avons observé des signes de toxicité du fipronil sur des animaux thyroïdectomisés et traités à la T3 à la dose de 10 mg/kg/j de fipronil. Selon la littérature, la LD₅₀ du fipronil par voie orale chez le rat est de 97 mg/kg, des signes de toxicité ont été observés après quelques jours avec une dose unique par voie orale ou des doses répétées par voie orale de 75 mg/kg/j [52]. Ces observations soulèvent la question d'une possible modulation de la clairance du fipronil par la T3 [27].

Les résultats de cet essai semblent indiquer tout d'abord un effet du statut thyroïdien sur le poids des animaux. En effet, à la fin de l'essai, le poids moyen des animaux thyroïdectomisés est nettement inférieur au poids moyen des animaux thyroïdectomisés supplémentés en T3. Cette observation concorde avec les résultats obtenus précédemment par d'autres auteurs [63]. Dans cette étude, les rats thyroïdectomisés prennent en moyenne moins de poids que les rats à thyroïde intacte, cette diminution de poids serait reliée à l'absence d'hormones thyroïdiennes chez les rats thyroïdectomisés.

Concernant la clairance de la T4, on observe un effet du statut thyroïdien sur la clairance de la T4 totale, par contre, aucun effet du traitement au fipronil n'est observé sur la clairance de la T4 totale, contrairement à l'expérience 2. Ceci peut être expliqué par le fait que la dose quotidienne de fipronil était inférieure (1.5 mg/kg/j vs 3 mg/kg/j pour l'expérience 2). L'effet du statut thyroïdien sur la clairance des hormones thyroïdiennes pourrait être attribué à une différence dans l'expression de la TBG. En accord avec l'hypothèse couramment admise, la TBG protégerait les hormones thyroïdiennes du métabolisme des hormones thyroïdiennes et diminuerait la clairance des hormones thyroïdiennes. Pour vérifier cette hypothèse et pour montrer que les rats thyroïdectomisés réexpriment la TBG, il faudrait évaluer les concentrations plasmatiques en TBG de manière quantitative ou semi-quantitative chez les rats thyroïdectomisés et chez les rats thyroïdectomisés supplémentés quotidiennement en T3. Après avoir validé ce modèle, cet essai pilote sera à reconduire en ajustant le protocole à nos observations. Il sera possible d'utiliser un traitement au fipronil à la dose de 3 mg/kg/j par voie orale par gavage pendant 14 jours puisque nous avons observé des effets sur les concentrations en hormones thyroïdiennes et sur la clairance de la T4 avec ce schéma d'exposition.

Le dosage des concentrations plasmatiques en fipronil et en fipronil sulfone chez les rats à thyroïde intacte après une exposition de 28 jours au fipronil, à raison de 3 mg/kg/j par voie orale, montre que les concentrations en fipronil sont inférieures à la limite de quantification (25 ng/mL) et que les concentrations en fipronil sulfone sont en moyennes de 2343 ng/mL.

Chez le rat, le chien, la chèvre et la poule, le métabolite majoritaire du fipronil est le fipronil sulfone [1]. Le fipronil sulfone agit comme le fipronil sur les récepteurs GABA, cependant, il est 6 fois plus sélectif pour les récepteurs GABA des vertébrés que le fipronil [16]. Chez le rat, nous avons démontré que l'exposition au fipronil sulfone est 20 à 40 fois supérieure à l'exposition au fipronil. Le fipronil sulfone pourrait être un acteur principal de la perturbation thyroïdienne et non le fipronil en lui-même. Les différences interspécifiques du fipronil pourraient résulter de différences interspécifiques de toxicocinétique. C'est pourquoi il serait intéressant d'étudier l'effet du fipronil sulfone sur la perturbation de la fonction thyroïdienne et sur la clairance de la T4, et de le comparer aux résultats obtenus avec le fipronil sur ces paramètres. En effet, chez l'homme également, le fipronil sulfone est le métabolite majeur du fipronil [16].

CONCLUSION

De nos jours, l'intérêt pour les perturbateurs endocriniens ne cesse d'augmenter, autant pour la communauté scientifique que pour la société. Le fipronil est un polluant environnemental mais il est aussi considéré comme perturbateur endocrinien. La perturbation endocrinienne peut se révéler sérieuse pour la santé humaine de par le rôle important que jouent les hormones dans le contrôle du développement. Toutes les substances soumises à autorisation font l'objet d'évaluations toxicologiques qui reposent sur des études expérimentales ayant lieu principalement chez le rat.

L'objectif de notre étude était d'identifier les mécanismes d'action du fipronil sur la fonction thyroïdienne. Pour cela, nous nous sommes basés sur les résultats observés lors des études de perturbation endocrinienne réalisées chez le rat par les industriels. Ainsi, il nous a été possible de montrer que le fipronil entraînait des perturbations thyroïdiennes, les concentrations en hormones thyroïdiennes étant significativement diminuées sous l'effet du traitement. Dans un second temps, nous avons établi que le fipronil provoquait une augmentation significative de la clairance de la T4. Grâce à ces résultats, nous avons pu valider notre hypothèse concernant les mécanismes d'action du fipronil sur la fonction thyroïdienne, à savoir que le fipronil provoquerait une augmentation de la clairance des hormones thyroïdiennes induisant une augmentation de la sécrétion de la TSH par une diminution du rétrocontrôle négatif exercé sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. Cette augmentation des concentrations plasmatiques en TSH pourrait être à l'origine du processus de carcinogenèse thyroïdienne. Ces résultats laissent supposer que le fipronil induit les enzymes du métabolisme hépatique des hormones thyroïdiennes. Enfin, dans un dernier temps, un essai pilote a permis d'évaluer l'influence de la TBG sur le potentiel perturbateur thyroïdien du fipronil. Nos résultats préliminaires suggèrent un effet du statut thyroïdien sur la clairance de la T4 totale.

L'évaluation des concentrations plasmatiques en fipronil et en fipronil sulfone indique que nous retrouvons principalement le fipronil sulfone dans l'organisme après une exposition au fipronil. Ces observations laisseraient supposer que le véritable acteur de la perturbation thyroïdienne après exposition au fipronil pourrait être son principal métabolite, le fipronil sulfone. Pour déterminer l'éventuel effet perturbateur thyroïdien du fipronil sulfone, il serait intéressant de réaliser de plus amples investigations.

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, A. MILON, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que
Melle Marion CAMP
a été admis(e) sur concours en : 2002
a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 12 Juillet 2007
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

Je soussignée, Véronique GAYRARD-TROY, Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
autorise la soutenance de la thèse de :

Melle Marion CAMP

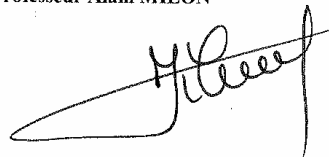
intitulée :

« Identification des mécanismes d'action du fipronil sur la fonction thyroïdienne chez le rat femelle »

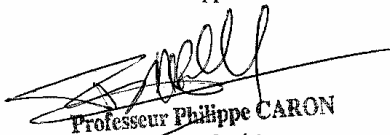
**Le Professeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeur Véronique GAYRARD-TROY**



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



**Vu :
Le Président de la thèse :
Professeur Philippe CARON**

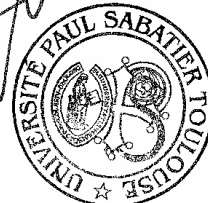
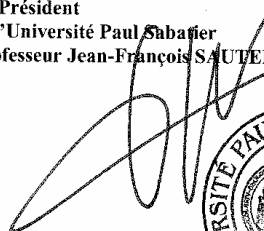


Professeur Philippe CARON

Chef de Service

Service d'Endocrinologie - Maladies Métaboliques - Nutrition
CHU TOULOUSE - Hôpital Larray
24, chemin de Pourville - TSA 30030
31069 TOULOUSE Cedex 9 - Tél. 05 67 77 17 01

**Vu le : 14 DEC. 2007
Le Président
de l'Université Paul Sabatier
Professeur Jean-François SAUTEREAU**



BIBLIOGRAPHIE

1. AGENCE FRANÇAISE DE SECURITE SANITAIRE DES ALIMENTS.
Evaluation des risques pour la santé humaine liée à une exposition au fipronil. [En ligne].
Adresse URL : www.academie-medecine.fr/UserFiles/File/rapports-thematiques/gestion-risques/Evaluation_des_risques_pour_la_sant_humaine_li_s_une_exposition_au_fipronil.pdf. Page consultée le 07/01/2008.
2. BALANI, S.K., ZHU, T., YANG, T.J., LIU, Z., HE, B., LEE, FW.
Effective dosing regimen of 1-aminobenzotriazole for inhibition of antipyrine clearance in rats, dogs, and monkeys.
Drug Metabolism and Disposition: the biological fate of chemicals, 2002, **30**, 10, 1059-1062.
3. BERNARD, A., ROUSSET, P.D., JOHN, T., DUNN, M.D.
Thyroid hormone synthesis and secretion [En ligne], Chapitre 2.
Adresse URL : www.thyroimanager.org. Page consultée le 17/01/2008.
4. BOAS, M., FELDT-RASMUSSEN, U., SKAKKEBAEK, N.E., MAIN, K.M.
Environmental chemicals and thyroid function.
European Journal of Endocrinology, 2006, **154**, 599-611.
5. BROWN, V.
Disrupting a delicate balance : environmental effects on the thyroid.
Environmental Health Perspectives, 2003, **111**, 12, 642-649.
6. COHARD, N.
Pertinence du modèle ovin par rapport au modèle rat pour l'étude de la toxicité thyroïdienne du fipronil.
Th.: Med. vet.: Toulouse : 2006, 4082, 60 pp.
7. DAS, P.C., CAO, Y., CHERRINGTON, N., HODGSON, E., ROSE, R.L.
Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes.
Chemico-Biological Interactions, 2006, **164**, 200-214.
8. DEGROOT, L.J.
Mechanisms of action of thyroid hormone.
In : *Endocrinology USA* : W.B. Saunders Company, 1989, 2nd edition, Vol.1, 563-571.
9. DEGROOT, L.J.
Thyroid hormone secretion.
In : *Endocrinology USA* : W.B. Saunders Company. 1989, 2nd edition, Vol.1, 523-537.
10. DEGROOT, L.J.
Transport, cellular uptake and metabolism of thyroid hormone.
In : *Endocrinology USA* : W.B. Saunders Company, 1989, 2nd edition, Vol.1, 541-555.

11. DISTEFANO, J.J. 3rd, FENG, D.
Comparative aspects of the distribution, metabolism and excretion of six iodothyronines in the rat.
Endocrinology, 1988, **123**, 5, 2514-2525.
12. DOHLER, K.D., WONG, C.C.
The rat as model for the study of drug effects on thyroid function : consideration of methodological problems.
Pharmacology and Therapeutics, 1979, **5**, 305-318.
13. FOWLES, J.R., FAIRBROTHER, A., BAECHEER-STEPPAN, L., KERKVLIT, N.I.
Immunologic and endocrine effects of the flame retardant pentabromodiphenyl ether (DE-71) in C57BL/6J mice.
Toxicology, 1994, **86**, 49-61.
14. GAYATHRI, N.S., DHANYA, C.R., INDU, A.R., KURUP, P.A.
Changes in some hormones by low doses of di (2-ethylhexyl) phtalates (DEHP) a commonly used plasticizer in PVC blood storage bags and medical tubing.
Indian Journal of Medical Research, 2004, **119**, 139-144.
15. GRAYLE., WILSON, V., NORIEGA, C., LAMBRIGHT, C., FURR, J., STOKER, T.E., LAWS, S.C., GOLDMAN, J., COOPER, R.L., FOSTER, P.M.D.
Use of the laboratory rat as a model in endocrine disruptor screening and testing.
ILAR Journal, 2004, **45**, 4, 425-437.
16. HAINZL, D., COLE, L.M., CASIDA, J.E.
Mechanisms for selective toxicity of fipronil insecticide and its sulfone metabolite and desulfinyl photoproduct.
Chemical Research in Toxicology, 1998, **11**, 1529-1535.
17. HAINZL, D., CASIDA, J.E.
Fipronil insecticide : novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1996, **93**, 12764-12767.
18. HALLGREN, S., DARNERUD, P.O.
Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychominated biphenyls (PCBs) on thyroid hormone and vitamin A levels in rats and mice.
Archives of Toxicology, 2002, **177**, 227-243.
19. HURLEY, P.M, HILL, R.N, WHITING, R.J,
Mode of carcinogenic action of pesticides inducing thyroid follicular cell tumors in rodents.
Environmental Health Perspectives, 1998, **106**, 8, 437-445.
20. IKEDA, T., ZHAO, X., NAGATA, K., KONO, Y., SHONO, T., YEH, J.Z.
Fipronil modulation of γ -Aminobutyric Acid_A receptors in rat dorsal root ganglion neurons.
Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2001, **296**, 3, 914-921.

21. INSANHRT, J.P, MCNABB, F.M., SMITH, P.N.
Effects of perchlorate exposure on resting metabolism, peak metabolism, and thyroid function in the prairie vole.
Environmental Toxicology and Chemistry, 2005, **24**, 678-684.
22. INSTITUT NATIONAL DE VEILLE SANITAIRE. Evolution de l'incidence et de la mortalité par cancer en France de 1978 à 2000. Adresse URL : http://www.invs.sante.fr/publications/2003/rapport_cancer_2003/index.html.
Page consultée le 17/01/2008.
23. KAKEYAMA, M., TOHYAMA, C.
Developmental neurotoxicity of dioxin and its related compounds.
Industrial Health, 2003, **41**, 215-230.
24. KANEKO, J.J
Thyroid function.
In : Clinical biochemistry of domestic animals, 5th edition, San Diego : Academic press, 1997, 571-588.
25. KAVLOCK, R.J., ANKLEY, G.T.
A perspective on the risk assessment process for endocrine-disruptive effects on wildlife and human health.
Risk Analysis, 1996, **16**, 731-739.
26. LARSEN, P.R., WILSON, J.D., FOSTER, D.W., KRONENBERG, H.M.
Thyroid.
In : Williams textbook of endocrinology. USA : WB Saunders company. 1998. 389-515.
27. LIDDLE, C., GOODWIN, B.J., GEORGE, J., TAPNER, M., FARRELL, G.C.
Separate and interactive regulation of cytochrome P450 3A4 by triiodothyronine, dexamethasone and growth hormone in cultured hepatocytes.
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 1998, **83**, 7, 2411-2416.
28. McCLAIN, R.M.
Mechanistic considerations for the relevance of animal data on thyroid neoplasia to human risk assessment.
Mutation Research, 1995, **333**, 1-2, 131-142.
29. MEERTS, I.A., ASSINK, Y., CENIJN, P.H., VAN DEN BERG, J.H., WEIJERS, B.M., BERGMAN, A., KOEMAN, J.H., BROUWER, A.
Placental transfer of a hydroxylated polychlorinated biphenyl and effects on fetal and maternal thyroid hormone homeostasis in the rat.
Toxicological Sciences, 2002, **68**, 361-371.
30. MEERTS, I.A., VAN ZANDEN, J.J, LUIJKS, E.A., LEEUWEN-BOL, I., MARSH, G., JAKOBSSON, E., BERGMAN, A., BROUWER, A.
Potent competitive interactions of some brominated flame retardants and related compounds with human transthyretin *in vitro*.
Toxicological Sciences, 2000, **56**, 95-104.

31. MORIYAMA, K., TAGAMI, T., AKAMIZU, T., USUI, T., SAIJO, M., KANAMOTO, N., HATAYA, Y., SHIMATZU, A., KUZUYA, H., NAKAO, K.
Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist.
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2002, **87**, 5185-5190.
32. MORSE, D.C, GROEN, D., VEERMAN, M., VAN AMERONGEN, C.J., KOETER, H.B., SMITS VAN PROOIJE, A.E., VISSER, T.J., KOEMAN, J.H., BROUWER, A.
Interference of polychlorinated biphenyls in hepatic and brain thyroid hormone metabolism in fetal and neonatal rats.
Toxicology and Applied Pharmacology, 1993, **122**, 27-33.
33. NAGAO, T., WADA, K., MARUMO, H., YOSHIMURA, S., ONO, H.
Reproductive effect of nonylphenol in rats after gavage administration : a two-generation study.
Reproductive Toxicology, 2001, **15**, 293-315.
34. NGUYEN, T.T., DISTEFANO, J.J. 3rd, YAMADA, H., YEN, Y.
Steady state organ distribution and metabolism of thyroxine and 3,5,3'-triiodothyronine in intestines, liver, kidneys, blood, and residual carcass of the rat in vivo.
Endocrinology, 1993, **133**, 6, 2973-2983.
35. 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, 2003, **144**, 2075-2083.
36. PAVUK, M., SCHECTER, A.J., AKHTAR, F.Z., MICHALEK, J.E.
Serum 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) levels and thyroid function in Air Force veterans of the Vietnam War.
Annals of Epidemiology, 2003, **13**, 335-343.
37. PRICE, S.C., CHESCOE, D., GRASSO, P., WRIGHT, M., HINTON, R.H.
Alterations in the thyroids of rats treated for long period with di-(2-ethylhexyl) phtalates or with hypolipidaemic agents.
Toxicology Letters, 1988, **40**, 37-46.
38. RAIS-BAHRAMI, K., NUNEZ, S., REVENIS, M.E., LUBAN, N.S., SHORT, B.L.
Follow-up study of adolescents exposed to di (2-ethylhexyl) phtalates (DEHP) as neonates on extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) support.
Environmental Health Perspectives, 2004, **112**, 1339-1340.
39. RAUH, J.J., LUMMIS, S.C.R., SATTELLE, D.B.
Pharmacological and biochemical properties of insect GABA receptors.
Trends in Pharmacological sciences, 1990, **11**,325-329.
40. REFETOFF S.
Thyroid hormone serum transport protein : structure, properties and genes and transcriptional regulation last. [En ligne], Chapitre 3a.
Adresse URL : www.thyroidmanager.org. Page consultée le 17/01/2008.

41. REFETOFF, S., ROBIN, N.I., FANG, V.S.
Parameters of thyroid function in serum of 16 selected vertebrates species : a study of PBI, serum T4, free T4, and pattern of T4 and T3 binding to serum proteins.
Endocrinology, 1970, **86**, 793-805.
42. SALA, M., SUNYER, J., HERRERO, C., TO-FIGURERAS, J., GRIMALT, J.
Association between serum concentrations of hexachlorobenzene and polychlorobiphenyls with thyroid hormone and liver enzymes in a sample of the general population.
Occupational and Environmental Medicine, 2001, **58**, 172-177.
43. SANDAU, C.D., AYOTTE, P., DEWAILLY, E., DUFFE, J., NORSTROM, R.J.
Pentachlorophenol and hydroxylated polychlorinated biphenyl metabolites in umbilical cord plasma of neonates from coastal populations in Quebec.
Environmental Health Perspectives, 2002, **110**, 411-417.
44. SAVU, L., VRANCKX, R., ROUAZE-ROMET, M., MAYA, M., NUNEZ, EA., TRETON, J., FLINK, I.L.
A senescence up-regulated protein : the rat thyroxine-binding globulin (TBG).
Biochimica and biophysica acta, 1991, **1097**, 19-22.
45. SCHMULTZER, C., HAMANN, I., HOFMANN, P.J., KOVACS, G., STEMMLER, M., MENTRUP, B., SCHOMBURG, L., AMBRUGGER, P., GRUTERS, A., SEIDLOVA-WUTTKE, D., JARRY, H., WUTTKE, W., KOHRLE, J.
Endocrine active compounds affect thyrotropin and thyroid hormone levels in serum as well as endpoints of thyroid hormone action in liver, heart and kidney.
Toxicology, 2004, **205**, 95-102.
46. SCHUSSLER, G.C.
The thyroid binding proteins.
Thyroid, 2002, **10**, 141-9.
47. SEIWA, C., NAKAHARA, N., MIYOSHI, H., YAMAUCHI, K., KOMIYAMA, Y., KATSU, Y., IGUCHI, T., ASOU, H.
Detection of thyroid system-disrupting chemicals using Bisphenol A exerts thyroid-hormone-like effects on mouse oligodendrocyte precursor cells.
Neuroendocrinology, 2004, **80**, 21-30.
48. SHARLIN, D.S., BANSAL, R., ZOELLER, R.T.
Polychlorinated biphenyls exert selective effects on cellular composition of white matter in a manner inconsistent with thyroid hormone insufficiency.
Endocrinology, 2006, **147**, 846-858.
49. SHIMADA, N., YAMUCHI, K.
Characteristics of 3,5,3'-triiodothyronine (T3)-uptake system tadpole red blood cells : effect of endocrine-disrupting chemicals on cellular T3 response.
Journal of Endocrinology, 2001, **183**, 627-637.

50. SUTHERLAND, R.L., SIMPSON-MORGAN, M.W.
The thyroxine-binding of serum proteins. A competitive binding technique employing sephadex G-25.
Journal of Endocrinology, 1975, **65**, 319-332.
51. 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, 2004, **147**, 319-329.
52. TINGLE, C.C., ROTHER, J.A., DEWHURST, C.F., LAUER, S., KING, W.J.
Fipronil : environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns.
Reviews of Environmental Contamination Toxicology, 2003, **176**, 1-66.
53. ULBRICH, B., STAHLMANN, R.
Developmental toxicity of polychlorinated biphenyls (PCBs) : a systematic review of experimental data.
Archives of Toxicology, 2004, **78**, 252-268.
54. US ENVIRONMENTAL AGENCY FEDERAL REGISTER
November 26, 1997, Volume 62, Number 228, 62970-62979.
55. VAN DEN BERG, K.J., ZURCHER, C., BROUWER, A.
Effects of 3,4,3',4'-tétrachlorobiphenyl on thyroid function and histology in marmoset monkeys.
Toxicology Letters, 1995, **41**, 77-86.
56. VANSELL, N.R., KLAASSEN, C.D.
Effect of microsomal enzyme inducers on the biliary excretion of triiodothyronine (T(3)) and its metabolites.
Toxicological Sciences, 2002, **65**, 2, 184-191.
57. VANSELL, N.R., KLAASSEN, C.D.
Increase in rat liver UDP-glucuronosyltransferase mRNA by microsomal enzyme inducers that enhance thyroid hormones glucuronidation.
Drug Metabolism and Disposition : the biological fate of chemicals, 2002, **30**, 3, 240-246.
58. VOGEL, J.
Measurement of cardiac output in small laboratory animals using recordings of blood conductivity.
American Journal of Physiology, 1997, **273**, 5, H2520-H2527.
59. VRANCKX, R., ROUAZE-ROMET, M., SAVU, L., MECHIHÉL, P., MAYA, M., NUNEZ, E.A.
Regulation of rat thyroxine-binding globulin and transthyretin : studies in thyroidectomized and hypophysectomized rats given triiodothyronine or/and growth hormone.
Journal of Endocrinology, 1994, **142**, 77-84.

60. YAMADA, H., DISTEFANO, J.J. 3rd, YEN, Y., NGUYEN, T.T.
Steady-state regulation of whole-body thyroid hormone pool sizes and interconversion rates in hypothyroid and moderately T₃ -stimulated rats.
Endocrinology, 1996, **137**, 12, 5624-5633.
61. YEN, P.M.
Cellular action of thyroid hormone. [En ligne], Chapitre 3d.
Adresse URL : www.thyroidmanager.org. Page consultée le 17/01/2008
62. YEN, Y.M., DISTEFANO, J.J. 3rd, YAMADA, H., NGUYEN, T.T.
Direct measurement of whole body thyroid hormones pool sizes and interconversion rates in fasted rats: hormone regulation implications.
Endocrinology, 1988, **122**, 4, 2318-2323.
63. YOUNG, R.A., MEYERS, B., ALEX, S., FANG, S.L., BRAVERMAN, L.E.
Thyroxine binding to serum thyronine-binding globulin in thyroidectomized adult and normal neonatal rats.
Endocrinology, 1988, **122**, 5, 2318-2323.
64. ZHAO, X., YEH, J.Z., SALGADO, V.L., NARAHASHI, T.
Sulfone metabolite of fipronil blocks γ -Aminobutyric Acid and Glutamate-Activated chloride channels in Mammalian and Insect neurons.
Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2005, **314**, 1, 363-373.
65. ZHOU, T., TAYLOR, M.M., DEVITO, M.J., CROFTON, K.M.
Developmental exposure to brominated diphenyl ethers results in thyroid hormone disruption.
Toxicological Sciences, 2002, **38**, 1496-1504.

Toulouse, 2008

NOM : CAMP

Prénom : MARION

TITRE : IDENTIFICATION DES MECANISMES D'ACTION DU FIPRONIL SUR LA FONCTION THYROÏDIENNE CHEZ LE RAT FEMELLE.

RESUME :

Le travail fait partie d'un projet intitulé "Fipronil et fonction thyroïdienne". Dans un premier temps, nous avons montré chez le rat que le fipronil administré par voie orale à la dose de 3 mg/kg/j induit une diminution des concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes et une augmentation de la sécrétion de TSH. Dans un second temps, nous avons montré que la diminution des concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes résulte d'une augmentation de la clairance de la thyroxine. L'augmentation de la sécrétion de TSH pourrait être expliquée par une diminution du rétrocontrôle négatif exercé par les hormones thyroïdiennes. Ces résultats sont utilisés pour valider le schéma physiopathologique du fipronil sur la fonction thyroïdienne chez le rat. Enfin, un essai pilote a été réalisé afin d'analyser l'influence de l'expression de la TBG sur les effets perturbateurs thyroïdiens du fipronil.

MOTS-CLES : FIPRONIL / RAT / FONCTION THYROÏDIENNE / THYROXINE / CLAIRANCE / THYROXIN-BINDING GLOBULINE / PERTURBATEURS ENDOCRINIENS

ENGLISH TITLE : IDENTIFICATION OF MECHANISMS OF ACTION OF FIPRONIL ON THYROID FUNCTION IN THE FEMALE RAT.

ABSTRACT :

This work is part of a project entitled "Fipronil and thyroid function". We first showed that an oral administration of fipronil at the dose of 3 mg/kg/d induces a decrease in thyroid hormones plasma concentrations and an increase in TSH secretion in the rat. Then, we demonstrated that the decrease in thyroid hormones plasma concentrations results from an increase in thyroxine clearance. The increase in TSH secretion would be explained by a decrease in the negative feedback exerted by thyroid hormones. These results allow us to validate the physiopathological scheme of fipronil action on thyroid function in the rat. Finally, a pilot study was realized in order to analyse the influence of TBG expression on the thyroid disruptor effects of fipronil.

KEYWORDS : FIPRONIL / RAT / THYROID FUNCTION / THYROXINE / CLEARANCE / THYROXIN-BINDING GLOBULINE / ENDOCRINE DISRUPTORS