



Bases mécanistiques des effets d'un insecticide agrovétérinaire, le fipronil,et/ou de ses métabolites sur la fonction thyroïdienne chez le rat

Béatrice Roques

► To cite this version:

Béatrice Roques. Bases mécanistiques des effets d'un insecticide agrovétérinaire, le fipronil,et/ou de ses métabolites sur la fonction thyroïdienne chez le rat. Sciences du Vivant [q-bio]. Institut National des Sciences Appliquées - Toulouse, 2012. Français. NNT: . tel-02806187

HAL Id: tel-02806187

<https://hal.inrae.fr/tel-02806187>

Submitted on 6 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université
de Toulouse

THÈSE

**En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**

Délivré par :

Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse (INSA Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Présentée et soutenue par :

Béatrice ROQUES

le : Mercredi 12 Décembre 2012

Titre :

Bases mécanistiques des effets d'un insecticide agrovétérinaire, le fipronil, et/
ou de ses métabolites sur la fonction thyroïdienne chez le rat

JURY

Madame le Professeur Anne Duittoz
Madame le Professeur Larissa Takser
Monsieur le Docteur Daniel Zalko
Madame le Docteur Catherine Viguié

Monsieur le Docteur Patrick Balaguer
Madame le Professeur Barbara Demeneix
Monsieur le Docteur Roger Rahmani
Monsieur le Docteur Pascal Martin

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

UMR1331 TOXALIM, Research Centre in Food Toxicology, INRA-ENVT

Directeur(s) de Thèse :

Madame le Docteur Catherine Viguié
Monsieur le Docteur Pascal Martin

Rapporteurs :

Madame le Professeur Anne Duittoz
Monsieur le Docteur Patrick Balaguer

A Mme Anne Duittoz et Mr Patrick Balaguer qui ont accepté d'être rapporteurs de cette thèse et de consacrer de leur temps à la lecture et à l'appréciation de ce manuscrit. A Mme Barbara Demeneix, Mme Larissa Takser, Mr Daniel Zalko et Mr Roger Rahmani qui ont accepté de participer à ce jury de thèse en qualité d'examineurs. Je tiens également à remercier Mr Daniel Zalko et Mr Roger Rahmani de m'avoir ouvert les portes de leurs laboratoires.

A Catherine Viguié, pour m'avoir guidée depuis le master et m'avoir fait découvrir le monde de la recherche. Je la remercie pour son investissement dans ce projet, pour ses remarques constructives et pour sa franchise qui m'ont poussée à aller toujours plus loin. Je n'oublierai pas les "abstract version 12", les "tu vas me détester mais..." ou les "c'est quand même mieux le mouton".

A Pascal Martin, pour m'avoir permis de comprendre qu'il faut de tout pour faire un bon chercheur et pour m'avoir fait confiance lors de cette année passée à l'INRA. Je le remercie de sa gentillesse et de sa bonne humeur en toutes circonstances.

A Mr Pierre-Louis Toutain et Mr Alain Bousquet-Mélou qui m'ont accueillie au sein de l'ancienne UMR181. Je les remercie pour leurs précieux conseils en pharmacocinétique et de m'avoir renouvelé leur confiance pour les mois à venir.

A Véronique Gayrard et Nicole Picard-Hagen, pour leur grande disponibilité, pour les conseils apportés lors de mes comités de thèse, des réunions d'équipe et lors de la rédaction de cette thèse et pour avoir toujours participé à ce projet avec enthousiasme.

A Karine Gauthier, Hervé Guillou et Jean-Pierre Cravedi qui ont accepté de suivre ce travail en participant à mon comité de thèse, pour leurs conseils et suggestions constructives. Et plus particulièrement à Hervé Guillou qui m'a accueillie dans son équipe et à Jean-Pierre Cravedi pour m'avoir lancé de nouveaux défis comme la thyroïdectomie sur rat congelé.

A la "dream team" de l'analytique sans qui rien n'aurait été possible. Merci à Sylvie Puel et Marlène Lacroix pour toutes les méthodes de dosage qu'elles ont développées pour moi et pour m'avoir fait une place dans leur bureau pendant les longues heures de rédaction de ce manuscrit. Promis je laisse le champ libre au BPA !

A nos biostatisticiens Didier Concordet et Céline Laffont-Rousset qui ont toujours répondu favorablement à mes problèmes d'analyse de données. A Yannick Lippi pour m'avoir toujours cru quand je disais que c'était la dernière PCR, pour sa bonne humeur et son humour.

A Elisabeth Perdu et Isabelle Jouanin, pour leur aide précieuse et leur contribution à ce projet. Je remercie également Elisabeth Perdu pour sa disponibilité et sa gentillesse en toutes circonstances. A Georges de Sousa, pour m'avoir transmis ses connaissances dans la mise en culture des hépatocytes même par -10°C ou $+35^{\circ}\text{C}$.

A toute l'équipe zootechnique de l'Ecole Vétérinaire: Kevin Arnoux, Sylvain Bruyas, Jean-Pierre Gau, Cédric Lacassagne, Joseph Maligoy et Valentin Rodriguez, pour m'avoir accompagnée tout au long de cette thèse, et à celle de l'INRA: Colette Bétoulières, Patrice Rouby et Caroline Sommer. Caroline, je te remercie aussi pour tous ces bons moments passés à l'animalerie, pour ta joie de vivre et pour tous nos bavardages autour d'un café.

A tous les anciens ou nouveaux thésards. A Alice Marmugi, Simon Ducheix et Alexandra Montagner qui m'ont adoptée lors de mon passage à l'INRA. A Julien Leghait pour son passage de témoin. A Anne-Sylvie Kesteman pour sa participation à ce projet de thèse (j'ai toujours les 8 euros de notre pari). A Julie Antic, Isabelle Bargues et Dalia Khachman, pour avoir partagé des pauses, des soirées et des rires. A Delphine Bibbal, c'est toujours un plaisir de te revoir parmi nous. A Elisabeth Jeunesse, pour tes "gâteaux sans gâteaux" et pour avoir toujours su gérer nos manips de l'extrême. A Aude Ferran pour la naissance d'une amitié qui je l'espère se prolongera au-delà de ces trois années de thèse. A Séverine Collet pour tous les bons moments passés ensemble et surtout pour tes mojitos. A quand le Chihuahua et la Porsche ? A Tanguy Corbel notre petit "Lemming" et à Maleck Vasseur notre futur véto sans qui le bureau des thésards aurait été beaucoup plus triste, bon courage les garçons pour la rédaction.

A tous les membres des ex-UMR181 et ex-UR66. Parce que sans la participation de chacun de vous ce travail ne serait pas ce qu'il est.

A tous ceux qui me sont proches et chers,
Ludo, pour ton soutien de chaque jour et pour tout ce que tu m'apportes
mes parents, mon frère et mes sœurs, pour avoir toujours été là quand j'en ai eu besoin
mes deux grands-pères, cette thèse vous est dédiée
mes deux grands-mères, pour vos multiples questions sur cette thèse et pour votre vitalité
mes tantes, oncles, cousins et cousines, pour tout ce qui fait qu'on est une famille.

Les travaux de cette thèse, ainsi que les travaux sur les thématiques de recherche des équipes auxquelles j'étais associée, ont fait l'objet des publications et communications suivantes.

Publications

Roques, B.B., Lacroix, M.Z., Puel, S., Gayrard, V., Picard-Hagen, N., Jouanin, I., Perdu, E., Martin, P.G., and Viguié, C. (2012). CYP450-dependent biotransformation of the insecticide fipronil into fipronil sulfone can mediate fipronil-induced thyroid disruption in rats. *Toxicol Sci*, **127**(1), 29-41.

Roques, B.B., Lacroix, M.Z., Puel, S., Gayrard, V., Picard-Hagen, N., Jouanin, I., Perdu, E., Martin, P.G., and Viguié, C. (*Under Press*). CYP450-dependent biotransformation of the insecticide fipronil into fipronil sulfone can mediate fipronil-induced thyroid disruption in rats - **Erratum**.

Viguié, C., Collet, S., Gayrard, V., Picard-Hagen, N., Puel, S., **Roques, B.B.**, Toutain, P.L., and Lacroix, M.Z. (*Under Press*). Maternal and fetal exposure to bisphenol A and modifications of thyroid function in pregnant ewes and their newborn lambs. *Endocrinology*.

Lacroix, M.Z., Puel, S., **Roques, B.B.**, Debrauwer, L., Viguié, C. (*Under Review*). Simultaneous quantification of thyroid hormones and their metabolites in rat plasma by UPLC/MS/MS: application for the evaluation of endocrine disruption. *Endocrinology*.

Communications orales

Roques, B.B., Lacroix, M.Z., Puel, S., Kesteman, A.S., Jouanin, I., Perdu, E., de Sousa, G., Rahmani, R., Gayrard, V., Picard-Hagen, N., and Viguié, C. (2011). Toxicologie comparative du fipronil et de son principal métabolite le fipronil sulfone: complémentarité des modèles animaux et cellulaires. 10^{èmes} Journées d'animation scientifique du département santé animale (JASDSA), Fréjus, France.

Roques, B.B., Lacroix, M.Z., Moussaoui, N., Leghait, J., Puel, S., Lasserre, F., Guillou, H., Viguié, C., and Martin, P.G.P. (2012). Contribution of the nuclear receptors PXR and CAR to gene expression modulations induced by fipronil in rodent liver. 12th International Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology (EAVPT), Noordwijkerhout, The Netherlands.

Roques, B.B., Lacroix, M.Z., Moussaoui, N., Leghait, J., Puel, S., Lasserre, F., Guillou, H., Viguié, C., and Martin, P.G.P. (2012). Contribution of the nuclear receptors PXR and CAR to gene expression modulations induced by fipronil in rodent liver. *4th Health Food Symposium, Toulouse, France.*

Roques, B.B., Lacroix, M.Z., Perdu, E., Polizzi, A., Lasserre, F., Puel, S., Gayrard, V., Picard-Hagen, N., Leghait, J., Martin, P.G.P., Viguié, C. (*Speaker*) (2012). Hepatic thyroid hormone transport and thyroid hormone metabolism interplay might be involved in fipronil-induced disruption of thyroid homeostasis. *French Endocrine Disruptor Research Programme (PNRPE) - Recent advances on the environmental and health effects of endocrine disruptors, Paris, France.*

Communications sous forme de poster

Roques, B.B., Gayrard, V., Kesteman, A.S., Lacroix, M.Z., Perdu, E., Picard-Hagen, N., Puel, S., and Viguié, C. (2010). Does the transformation of fipronil into fipronil sulfone lead to a bioactivation of fipronil potential as a thyroid disruptor ? *7th Gordon Research Conference on Environmental Endocrine Disruptors, Les Diablerets, Switzerland.*

Roques, B.B., Gayrard, V., Kesteman, A.S., Lacroix, M.Z., Perdu, E., Picard-Hagen, N., Puel, S., and Viguié, C. (2010). Does the transformation of fipronil into fipronil sulfone lead to a bioactivation of fipronil potential as a thyroid disruptor ? *1st European Doctoral College on Environment and Health (EDCEH), Rennes, France.*

Puel, S., Lacroix, M.Z., **Roques, B.B.**, and Viguié, C. (2011). Développement d'une nouvelle méthode de dosage des hormones thyroïdiennes (HT) et métabolites par UHPLC/MS/MS. *10^{èmes} Journées d'animation scientifique du département santé animale (JASDSA), Fréjus, France.*

Roques, B.B., de Sousa, G., Lacroix, M.Z., Puel, S., Rahmani, R., and Viguié, C. (2011). Development of a rat primary cultured hepatocyte model for the screening of potential thyroid disruptors acting on hepatic metabolic pathways of thyroid hormones, application to fipronil. *6th Copenhagen Workshop on Endocrine Disruptors, University Department of Growth and Reproduction, Rigshospitalet, Denmark.*

Lacroix, M.Z., Puel, S., **Roques, B.B.**, Debrauwer, L., and Viguié, C. (2012). Quantification des hormones thyroïdiennes (HT) et métabolites par UPLC/MS/MS. *CT4, INRA, département AlimH, Perturbateurs endocriniens et métaboliques, Dijon, France*

INTRODUCTION	25
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	27
A. LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS	28
1. DEFINITION	28
2. INTERET DE L'ETUDE DES PERTURBATEURS THYROÏDIENS	28
B. PERTURBATEURS THYROÏDIENS ET SYNTHÈSE DES HORMONES THYROÏDIENNES	30
1. PERTURBATION DE LA PRODUCTION DES HORMONES THYROÏDIENNES	30
a. La production des hormones thyroïdiennes	30
b. Inhibition de la captation de l'iode	31
c. Inhibition de la thyroperoxydase	32
2. PERTURBATION DU RETROCONTROLE NEGATIF	32
a. Une régulation hypothalamo-hypophysaire	32
b. Inhibition de la libération des hormones thyroïdiennes	33
C. PERTURBATEURS THYROÏDIENS ET TRANSPORT DES HORMONES THYROÏDIENNES	34
1. PERTURBATION DU TRANSPORT PLASMATIQUE DES HORMONES THYROÏDIENNES	34
a. La Thyroxine-Binding Globulin	34
b. La Transthyrétine	35
c. L'albumine	35
d. Différences interspécifiques	36
e. Liaison compétitive avec les protéines de transport plasmatiques	37
2. PERTURBATION DU TRANSPORT CELLULAIRE DES HORMONES THYROÏDIENNES	38
a. Les Organic Anion-Transporting Polypeptides	38
b. Les Multidrug Resistance-Associated Proteins	39
c. Les Monocarboxylate Transporters	40
d. Les L-type Amino acid Transporters	41
e. Le Na ⁺ /Taurocholate Cotransporting Polypeptide	41
f. Modulation du transport membranaire	41
D. PERTURBATEURS THYROÏDIENS ET METABOLISME DES HORMONES THYROÏDIENNES	42
1. PERTURBATION DES ENZYMES RESPONSABLES DE LA METABOLISATION DES HORMONES THYROÏDIENNES	42
a. Les désiodases	42
b. Les enzymes de conjugaison	43
c. Clivage de la liaison éther	45
d. Désamination et décarboxylation	45
e. Bilan des voies de métabolisation des hormones thyroïdiennes	46
f. Modulation de la métabolisation des hormones thyroïdiennes	46

2. UNE REGULATION DU METABOLISME VIA DES RECEPTEURS NUCLEAIRES XENONSENSEURS	47
a. Structure et fonctionnement des récepteurs nucléaires	47
b. Récepteurs nucléaires xénosenseurs et métabolisme des hormones thyroïdiennes	48
E. PERTURBATEURS THYROÏDIENS ET ACTION DES HORMONES THYROÏDIENNES	51
1. PERTURBATION DES RECEPTEURS NUCLEAIRES DES HORMONES THYROÏDIENNES	51
a. Les récepteurs nucléaires des hormones thyroïdiennes	51
b. Corépresseurs et coactivateurs	52
c. Modulation de l'activité des récepteurs nucléaires des hormones thyroïdiennes par des contaminants	53
2. LE CAS PARTICULIER DES RECEPTEURS MITOCHONDRIaux	54
F. LE CAS DE L'INSECTICIDE AGROVETERINAIRE FIPRONIL	55
1. HISTORIQUE ET LEGISLATION	55
2. MODE D'ACTION	55
3. METABOLISME	57
4. LES DONNEES DES EVALUATIONS TOXICOLOGIQUES REGLEMENTAIRES	58
a. Toxicité aiguë	59
b. Effet perturbateur thyroïdien du fipronil et différences interspécifiques	59
c. Un effet perturbateur thyroïdien du fipronil qui peut être lié à la métabolisation du fipronil en fipronil sulfone	61
G. OBJECTIFS ET PROJET DE THESE	62
ETUDE EXPERIMENTALE	63
CHAPITRE 1: MODELES D'ETUDE ET METHODES D'ANALYSE GENERaux	65
A. TRAITEMENT AU FIPRONIL ET AU FIPRONIL SULFONE	66
1. FIPRONIL	66
2. FIPRONIL SULFONE	66
3. PIPERONYL BUTOXIDE	66
4. PREPARATION DES SOLUTIONS DE TRAITEMENT	66
5. MODALITES D'ADMINISTRATION DES TRAITEMENTS	67
B. MODELES ANIMAUX	69
1. ORIGINE ET HEBERGEMENT DES ANIMAUX	69
2. MODELE DE RAT PSEUDO-EUTHYROÏDIEN	70
3. PRELEVEMENTS SANGUINS SERIES	71
4. PRELEVEMENTS TERMINAUX	71
C. MODELES CELLULAIRES	72
1. ORIGINE ET OBTENTION DES HEPATOCYTES	72

2. REACTIFS	72
3. MODALITES DE MISE EN CULTURE DES HEPATOCYTES	72
D. METHODES D'ANALYSE	73
1. DOSAGE DU FIPRONIL ET DU FIPRONIL SULFONE	73
a. HPLC/MS/MS	73
b. HPLC/UV/MS	73
c. UPLC/MS/MS	74
2. DOSAGE DES HORMONES THYROÏDIENNES	74
a. T ₄ , T ₃ et TSH par dosage radioimmunologique	74
b. Métabolites des hormones thyroïdiennes et ¹³ C ₆ -LT ₄ par UPLC/MS/MS	75
3. DETERMINATION DES EXPRESSIONS DES ARNm PAR RT-QPCR	76
a. Toxicologie comparative du fipronil et du fipronil sulfone <i>in vivo</i>	76
b. Mécanismes moléculaires de la perturbation thyroïdienne engendrée par un traitement au fipronil	76
4. ANALYSES PHARMACOCINETIQUES	79
a. Thyroxine et antipyrine <i>in vivo</i>	79
b. Thyroxine <i>in vitro</i>	79
5. ANALYSES STATISTIQUES	80

CHAPITRE 2: CARACTERISATION DE L'EXPOSITION AU FIPRONIL ET AU FIPRONIL SULFONE PAR VOIE ORALE CHEZ LE RAT

A. PROBLEMATIQUE, HYPOTHESES ET OBJECTIFS	82
B. EVOLUTION DES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES EN FIPRONIL ET EN FIPRONIL SULFONE APRES DES ADMINISTRATIONS REPETEES DE FIPRONIL	83
1. MATERIELS ET METHODES	83
a. Plan expérimental	83
b. Analyse pharmacocinétique	83
2. RESULTATS	84
3. CONCLUSION	86
C. PARAMETRES PHARMACOCINETIQUES DU FIPRONIL ET DU FIPRONIL SULFONE APRES UNE ADMINISTRATION UNIQUE DE FIPRONIL OU DE FIPRONIL SULFONE	87
1. MATERIELS ET METHODES	87
a. Plan expérimental	87
b. Analyse pharmacocinétique	87
2. RESULTATS	88
3. CONCLUSIONS	89

D. ESSAI DE REDUCTION DE LA BIOTRANSFORMATION DU FIPRONIL EN FIPRONIL SULFONE AVEC UNE DOSE UNIQUE DE PIPERONYL BUTOXIDE	91
1. MATERIELS ET METHODES	91
2. RESULTATS	91
3. CONCLUSIONS	92
E. ESSAI DE REDUCTION DE LA BIOTRANSFORMATION DU FIPRONIL EN FIPRONIL SULFONE AVEC DES DOSES CROISSANTES DE PIPERONYL BUTOXIDE	93
1. MATERIELS ET METHODES	93
2. RESULTATS	93
3. CONCLUSIONS	94
F. DISCUSSION	95

CHAPITRE 3: TOXICOLOGIE COMPARATIVE DU FIPRONIL ET DU FIPRONIL SULFONE *IN VIVO*

A. PROBLEMATIQUE, HYPOTHESES ET OBJECTIFS	98
B. COMPARAISON DES EFFETS PERTURBATEURS THYROÏDIENS D'UN TRAITEMENT AU FIPRONIL OU AU FIPRONIL SULFONE CHEZ LE RAT	99
1. MATERIELS ET METHODES	99
a. Préparation des solutions d'hormones thyroïdiennes	99
b. Plan expérimental	99
c. Fractions subcellulaires et dosages de protéines	100
d. Activité de conjugaison du 4-nitrophénol par les UGT1A	101
e. Activité de sulfoconjugaison du 2-naphthol par les SULT conjuguant les phénols	101
2. RESULTATS	102
a. Effet du traitement sur le poids des animaux et le poids des foies	102
b. Concentrations plasmatiques en fipronil et en fipronil sulfone	102
c. Caractérisation de l'état pseudo-euthyroïdien	102
d. Effet du traitement sur les paramètres pharmacocinétiques de la T ₄ totale et de la T ₄ libre	102
e. Effet du traitement sur le profil métabolique des hormones thyroïdiennes	104
f. Effet du traitement sur l'expression des ARNm des <i>Ugt1a1</i> et des <i>Sult1b1</i> et sur l'activité des UGT1A et des SULT conjuguant les phénols	106
C. COMPARAISON DES EFFETS D'UN TRAITEMENT AU FIPRONIL OU AU FIPRONIL SULFONE CHEZ LE RAT SUR L'ACTIVATION DES CYP	107
1. MATERIELS ET METHODES	107
a. Préparation de la solution d'antipyrine et dosage de l'antipyrine	107

b. Plan expérimental	107
c. Fractions subcellulaires et dosages de protéines	108
d. Expression protéique des CYP3A	108
2. RESULTATS	109
a. Effet du traitement sur le poids des animaux et le poids des foies	109
b. Concentrations plasmatiques en fipronil et en fipronil sulfone	110
c. Effet du traitement sur les paramètres pharmacocinétiques de l'antipyrine	110
d. Effet du traitement sur l'expression des ARNm des <i>Cyp1a1</i> , <i>Cyp1a2</i> , <i>Cyp2b2</i> , <i>Cyp3a1</i> et <i>Cyp3a2</i> et sur l'expression protéique des CYP3A	111
D. DISCUSSION	114
CHAPITRE 4: TOXICOLOGIE COMPARATIVE D'ESPECE IN VITRO	119
A. PROBLEMATIQUE, HYPOTHESES ET OBJECTIFS	120
B. DEVELOPPEMENT SUR HEPATOCYTES DE RAT: DETERMINATION DES CONDITIONS DE MISE EN CULTURE POUR ETUDIER UN EFFET PERTURBATEUR THYROÏDIEN	121
1. MATERIELS ET METHODES	121
a. Préparation des solutions d'hormones thyroïdiennes	121
b. Préparation des solutions de fipronil et de fipronil sulfone	121
c. Plan expérimental	122
d. In Cell Western	122
2. RESULTATS	123
a. Biotransformation du fipronil en fipronil sulfone	123
b. Effet de la présence ou de l'absence de T ₃ sur l'expression protéique des CYP3A	124
c. Effet d'un traitement au fipronil ou au fipronil sulfone sur l'expression protéique des CYP3A	125
d. Effet perturbateur thyroïdien d'un traitement au fipronil ou au fipronil sulfone	126
3. CONCLUSIONS	127
C. DEVELOPPEMENT SUR HEPATOCYTES DE RAT: EFFETS DE L'INHIBITION DE LA BIOTRANSFORMATION DU FIPRONIL EN FIPRONIL SULFONE SUR LA PERTURBATION THYROÏDIENNE	128
1. MATERIELS ET METHODES	128
a. Préparation des solutions d'hormones thyroïdiennes	128
b. Préparation des solutions de fipronil, de fipronil sulfone et de piperonyl butoxide	128
c. Plan expérimental	129
2. RESULTATS	130
a. Biotransformation du fipronil en fipronil sulfone	130
b. Effet perturbateur thyroïdien des différents traitements	131

3. CONCLUSIONS	133
D. DIFFERENCES INTERSPECIFIQUES DANS LA PERTURBATION THYROÏDIENNE INDUITE PAR UN TRAITEMENT AU FIPRONIL OU AU FIPRONIL SULFONE	135
1. MATERIELS ET METHODES	135
a. Préparation de la solution de thyroxine	135
b. Préparation des solutions de fipronil et de fipronil sulfone	135
c. Plan expérimental	136
d. Test de cytotoxicité	137
2. RESULTATS	137
a. Cytotoxicité des différents traitements	137
b. Biotransformation du fipronil en fipronil sulfone	138
c. Effet perturbateur thyroïdien d'un traitement au fipronil ou au fipronil sulfone chez les différentes espèces	142
3. CONCLUSIONS	143
E. DISCUSSION	145

**CHAPITRE 5: MECANISMES MOLECULAIRES DE LA PERTURBATION THYROÏDIENNE
ENGENDREE PAR UN TRAITEMENT AU FIPRONIL**

A. PROBLEMATIQUE, HYPOTHESES ET OBJECTIFS	150
B. IMPACT DU FIPRONIL SUR LE TRANSCRIPTOME HEPATIQUE DE RAT	151
1. MATERIELS ET METHODES	151
a. Plan expérimental	151
b. Puces à ADN	151
2. RESULTATS	152
a. Effet du traitement sur le poids des animaux	152
b. Concentrations plasmatiques en fipronil et en fipronil sulfone	152
c. Potentiel perturbateur thyroïdien du fipronil	152
d. Voies métaboliques hépatiques modulées par le fipronil	153
3. CONCLUSIONS	156
C. IMPACT DU FIPRONIL SUR LE TRANSCRIPTOME HEPATIQUE CHEZ LA SOURIS	157
1. MATERIELS ET METHODES	157
2. RESULTATS	157
a. Effet du traitement sur le poids des animaux et le poids des foies	157
b. Voies métaboliques hépatiques modulées par le fipronil	157
3. CONCLUSIONS	161

D. IMPLICATION DES RECEPTEURS NUCLEAIRES CAR ET PXR DANS LA PERTURBATION THYROÏDIENNE ENGENDREE PAR UN TRAITEMENT AU FIPRONIL	162
1. MATERIELS ET METHODES	162
a. Préparation de la solution de $^{13}\text{C}_6\text{-LT}_4$	162
b. Plan expérimental	162
2. RESULTATS	163
a. Effet du traitement et du génotype sur le poids des animaux et le poids des foies	163
b. Concentrations plasmatiques en fipronil et en fipronil sulfone	163
c. Potentiel perturbateur thyroïdien du fipronil	164
d. Voies métaboliques hépatiques modulées par le fipronil	165
3. CONCLUSIONS	166
E. EFFET D'UNE FORTE DOSE DE FIPRONIL SUR LA REGULATION DE L'EXPRESSION DE GENES HEPATIQUES CHEZ DE JEUNES SOURIS SAUVAGES, CAR^{-/-} ET PXR^{-/-}	168
1. MATERIELS ET METHODES	168
2. RESULTATS	168
a. Effet du traitement et du génotype sur le poids des animaux et le poids des foies	168
b. Potentiel perturbateur thyroïdien du fipronil	168
c. Voies métaboliques hépatiques modulées par le fipronil	169
3. CONCLUSIONS	170
F. DISCUSSION	172
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	175
ARTICLE TOXICOLOGIE COMPARATIVE <i>IN VIVO</i>	183
ERRATUM ARTICLE TOXICOLOGIE COMPARATIVE <i>IN VIVO</i>	197
REFERENCES	201

Figure 1: Effets potentiels des perturbateurs thyroïdiens sur la synthèse, le transport, le métabolisme et le mode d'action des hormones thyroïdiennes.	29
Figure 2: Structure des hormones thyroïdiennes thyroxine (T_4) et triiodothyronine (T_3).	30
Figure 3: Structure des iodotyrosines MIT (monoiodotyrosine) et DIT (diiodotyrosine).	30
Figure 4: Production des hormones thyroïdiennes par les follicules thyroïdiens.	31
Figure 5: Analogie structurale entre la T_4 et les polychlorobiphényles (PCB), le pentachlorophénol (PCP), et les retardateurs de flamme pentabromophénol (PBP), polybromodiphényléthers (PBDE) et tetrabromobisphénol A (TBBPA).	37
Figure 6: Sites de suppression potentielle d'un iode par les désiodases.	42
Figure 7: Les voies de métabolisation des hormones thyroïdiennes	46
Figure 8: Structure des récepteurs nucléaires.	47
Figure 9: Les quatre groupes de récepteurs nucléaires.	47
Figure 10: Corépresseurs et coactivateurs des récepteurs nucléaires des hormones thyroïdiennes.	53
Figure 11: Métabolisme du fipronil	57
Figure 12: Evolution des concentrations plasmatiques moyennes ($\pm$ ET) en fipronil et en fipronil sulfone après des administrations répétées de fipronil à des rates par voie orale.	84
Figure 13: Exemple représentatif pour une des rates d'ajustement de l'évolution des concentrations plasmatiques en fipronil après des administrations répétées de fipronil par voie orale.	85
Figure 14: Evolution des concentrations plasmatiques moyennes ($\pm$ ET) en fipronil et en fipronil sulfone après une administration unique de fipronil ou de fipronil sulfone à des rates par voie iv ou par voie orale.	89
Figure 15: Hypothèse d'un effet perturbateur thyroïdien du fipronil sulfone	90
Figure 16: Concentrations plasmatiques moyennes ($\pm$ ET) en fipronil et en fipronil sulfone après administration à des rates de fipronil et d'une dose de piperonyl butoxide par voie orale.	92
Figure 17: Concentrations plasmatiques moyennes ($\pm$ ET) en fipronil et en fipronil sulfone après administration à des rates de fipronil et de trois doses successives de piperonyl butoxide par voie orale.	93
Figure 18: Schéma du plan expérimental mis en place pour déterminer l'effet du fipronil et du fipronil sulfone sur la clairance de la T_4 .	100
Figure 19: Effet du fipronil et du fipronil sulfone sur l'évolution des concentrations plasmatiques et la clairance de la TT4 et de la FT4 chez des rates thyroïdectomisées et supplémentées en T_3 .	103
Figure 20: Evolution des concentrations plasmatiques moyennes ($\pm$ ET des deux pools) en T_4 , en T_3 et en T_2 après un bolus ip de T_4 à des rates THX + T_3 traitées avec du solvant, du fipronil ou du fipronil sulfone.	105
Figure 21: Effet du fipronil et du fipronil sulfone sur l'expression des ARNm et l'activité des enzymes de conjugaison de la T_4 .	106
Figure 22: Schéma du plan expérimental mis en place pour déterminer l'effet du fipronil et du fipronil sulfone sur l'induction des CYP.	108
Figure 23: Effet du fipronil et du fipronil sulfone sur l'évolution des concentrations plasmatiques et la clairance de l'antipyrine chez des rates thyroïdectomisées et supplémentées en T_3 .	110

Figure 24: Effet du fipronil et du fipronil sulfone sur l'expression des ARNm des cytochromes P450 métabolisant le fipronil et/ou l'antipyrine.	112
Figure 25: Signal d'immunoréactivité correspondant au CYP3A obtenu pour une rate THX + T ₃ représentative traitée au solvant, au fipronil ou au fipronil sulfone (A) et intensité relative moyenne ($\pm$ ET) de ce signal pour chaque groupe (B).	113
Figure 26: Plan expérimental mis en place afin d'établir les conditions de culture permettant d'étudier un effet perturbateur thyroïdien sur hépatocytes de rat.	122
Figure 27: Evolution des concentrations extracellulaires moyennes en fipronil et en fipronil sulfone ($\pm$ ET) après incubation d'hépatocytes de rat avec du fipronil à 2 μ M.	124
Figure 28: Effet de la présence ou de l'absence de T ₃ sur l'expression protéique des CYP3A.	125
Figure 29: Effet d'un traitement au fipronil ou au fipronil sulfone sur l'expression protéique des CYP3A dans des hépatocytes de rat en présence de T ₃ .	125
Figure 30: Evolution des concentrations extracellulaires moyennes en T ₄ ($\pm$ ET) après incubation d'hépatocytes de rat avec du solvant, du fipronil à 2 μ M ou du fipronil sulfone à 2 μ M.	126
Figure 31: Plan expérimental mis en place pour évaluer les effets d'une inhibition de la biotransformation du fipronil en fipronil sulfone par le piperonyl butoxide.	129
Figure 32: Evolution des concentrations extracellulaires moyennes en fipronil et en fipronil sulfone après incubation d'hépatocytes de rat avec du fipronil à 2.5 μ M avec ou sans piperonyl butoxide, ou du fipronil sulfone à 2.5 μ M.	130
Figure 33: Evolution des concentrations extracellulaires moyennes en T ₄ ($\pm$ ET) après incubation d'hépatocytes de rat avec du solvant $\pm$ piperonyl butoxide, du fipronil à 2.5 μ M $\pm$ piperonyl butoxide, ou du fipronil sulfone à 2.5 μ M.	132
Figure 34: Clairance de la T ₄ après le traitement d'hépatocytes de rat avec du solvant $\pm$ piperonyl butoxide, du fipronil $\pm$ piperonyl butoxide, ou du fipronil sulfone.	133
Figure 35: Plan expérimental mis en place pour évaluer les différences interspécifiques dans la perturbation thyroïdienne induite par un traitement au fipronil ou au fipronil sulfone.	136
Figure 36: Effet d'un traitement au fipronil ou au fipronil sulfone sur la viabilité des hépatocytes de rat, de mouton et d'Homme.	138
Figure 37: Evolution des concentrations extracellulaires moyennes en fipronil et en fipronil sulfone ($\pm$ ET) après incubation d'hépatocytes de rat, de mouton et d'Homme avec différentes doses de fipronil ou de fipronil sulfone à J2 et à J3.	139
Figure 38: Evolution des concentrations extracellulaires et intracellulaires moyennes en fipronil et en fipronil sulfone ($\pm$ ET) après incubation d'hépatocytes de rat, de mouton et d'Homme avec différentes doses de fipronil ou de fipronil sulfone.	141
Figure 39: Evolution des concentrations extracellulaires moyennes en T ₄ ($\pm$ ET) après incubation d'hépatocytes de rat, de mouton et d'Homme avec du solvant, du fipronil à 0.1 ou 4 μ M, ou du fipronil sulfone à 0.1 ou 4 μ M.	142

Figure 40: Concentrations plasmatiques moyennes ($\pm$ ET) en TT4, FT4, TT3, FT3 et TSH chez des rates traitées avec du solvant ou du fipronil.	153
Figure 41: Profil d'expression génique hépatique lors d'un traitement au fipronil chez le rat.	154
Figure 42: Effet du fipronil sur l'expression des ARNm de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides chez le rat.	154
Figure 43: Comparaison des profils d'expression génique hépatiques obtenus lors du traitement de rates avec du fipronil, du phénobarbital ou de la pregnenolone-16 α -carbonitrile.	155
Figure 44: Effet du fipronil sur l'expression des ARNm des récepteurs nucléaires CAR et PXR et des gènes impliqués dans le métabolisme et le transport des xénobiotiques et de composés endogènes comme les hormones thyroïdiennes chez le rat.	156
Figure 45: Effet du fipronil sur l'expression des ARNm de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides chez la souris.	158
Figure 46: Effet chez la souris du fipronil sur l'expression des ARNm des orthologues des gènes les plus surexprimés chez le rat lors d'un traitement avec l'insecticide.	159
Figure 47: Effet du fipronil sur l'expression des ARNm de gènes impliqués dans le métabolisme et le transport des xénobiotiques et de composés endogènes chez la souris.	160
Figure 48: Concentrations plasmatiques moyennes ($\pm$ ET) en fipronil et en fipronil sulfone chez des souris sauvages, CAR ^{-/-} et PXR ^{-/-} ayant reçu 3 mg/kg/j de fipronil par voie orale pendant 14 jours.	163
Figure 49: Effet du fipronil sur l'évolution des concentrations plasmatiques et la clairance de la ¹³ C ₆ -LT ₄ chez des souris sauvages, CAR ^{-/-} et PXR ^{-/-} ayant reçu 3 mg/kg/j de fipronil par voie orale pendant 14 jours.	164
Figure 50: Effet du fipronil sur l'expression des gènes Cyp2b10, Cyp3a11, Ces2a, Gsta2, Abcc3 et Slco1a4 chez des souris sauvages, CAR ^{-/-} et PXR ^{-/-} ayant reçu 3 mg/kg/j de fipronil par voie orale pendant 14 jours.	166
Figure 51: Concentrations plasmatiques moyennes ($\pm$ ET) en TT4 et en TT3 chez des souris sauvages, CAR ^{-/-} ou PXR ^{-/-} ayant reçu 10 mg/kg/j de fipronil par voie orale pendant 14 jours.	169
Figure 52: Effet du fipronil sur l'expression des gènes Cyp2b10, Cyp3a11, Ces2a, Gsta2, Abcc3 et Slco1a4 chez des souris sauvages, CAR ^{-/-} et PXR ^{-/-} ayant reçu 10 mg/kg/j de fipronil par voie orale pendant 14 jours.	170
Figure 53: Proposition d'un schéma physiopathologique de la perturbation thyroïdienne engendrée par un traitement au fipronil chez le rat.	176

Tableau 1: Concentrations en hormones thyroïdiennes totales et libres dans le sérum de sujets avec une concentration en TBG normale, forte ou faible.	35
Tableau 2: Caractéristiques physico-chimiques des protéines plasmatiques de transport des hormones thyroïdiennes chez l'Homme.	36
Tableau 3: Fraction libre et temps de demi-vie des hormones thyroïdiennes chez l'Homme, le rat et la souris.	37
Tableau 4: Localisation des OATP chez l'Homme.	39
Tableau 5: Localisation des MRP chez l'Homme.	39
Tableau 6: Localisation des MCT chez l'Homme.	40
Tableau 7: Localisation des LAT chez l'Homme.	41
Tableau 8: Propriétés biochimiques et distribution tissulaire des désiodases chez l'Homme.	43
Tableau 9: Perturbateurs endocriniens connus pour être des ligands de CAR et/ou de PXR.	48
Tableau 10: Enzymes responsables du métabolisme des hormones thyroïdiennes et transporteurs membranaires modulés par les récepteurs nucléaires CAR et PXR.	49
Tableau 11: Ligands non endogènes de CAR et de PXR chez la souris et l'Homme.	50
Tableau 12: Modifications physiologiques observées chez des souris déficientes pour les différentes isoformes des récepteurs nucléaires des hormones thyroïdiennes.	52
Tableau 13: Modalités d'administration du fipronil, du fipronil sulfone et du piperonyl butoxide dans les différentes expérimentations.	67
Tableau 14: Séquences des primers utilisés dans le chapitre 3	76
Tableau 15: Séquences des primers utilisés dans le chapitre 5 chez le rat	77
Tableau 16: Séquences des primers utilisés dans le chapitre 5 chez la souris	78
Tableau 17: Paramètres pharmacocinétiques moyens ($\pm$ ET) du fipronil lors d'une administration répétée de fipronil à des rates par voie orale.	85
Tableau 18: Paramètres pharmacocinétiques moyens ($\pm$ ET) de la T_4 totale et de la T_4 libre chez des rates THX + T_3 traitées avec du solvant, du fipronil ou du fipronil sulfone.	104
Tableau 19: Paramètres pharmacocinétiques moyens ($\pm$ ET) de l'antipyrine chez des rates THX + T_3 traitées avec du solvant, du fipronil ou du fipronil sulfone.	111
Tableau 20: Exemples d'inhibiteurs des transporteurs transmembranaires des hormones thyroïdiennes chez l'Homme.	179

ABC:	ATP binding cassette
ADN:	Acide désoxyribonucléique
AFSSA:	Agence française de sécurité sanitaire des aliments
AhR:	Aryl hydrocarbon receptor
ANOVA:	Analyse de la variance (Analysis of variance)
ARN:	Acide ribonucléique
AUC:	Aire sous la courbe des concentrations (Area under the curve)
CAR	Constitutive androstane receptor
CBP:	CREB-binding protein
CL ₅₀ :	Concentration létale 50
Cmax:	Concentration maximale
CYP:	Cytochromes P450
DBD:	DNA binding domain (domaine de fixation à l'ADN)
DDT:	Dichlorodiphényltrichloroéthane
DEHAL:	Iodotyrosine déhalogénase
DIT:	Diiodotyrosine
DL ₅₀ :	Dose létale 50
DMSO:	Diméthylsulfoxyde
DRIP:	vitamin D receptor interacting protein
EFSA:	European food safety authority
ENVT:	Ecole nationale vétérinaire de Toulouse
ES:	Erreur standard
ET:	Ecart-type
FSH:	Follicle-stimulating hormone
FT3:	T ₃ libre (Free T ₃)
FT4:	T ₄ libre (Free T ₄)
GABA:	Acide γ-aminobutyrique
HCG:	Human chorionic gonadotropin
HDAC:	Histone deacetylase
HPLC:	High performance liquid chromatography
HT:	Hormones thyroïdiennes
INRA:	Institut national de la recherche agronomique
InVS:	Institut de veille sanitaire
ip:	Voie intrapéritonéale
iv:	Voie intraveineuse
KO:	Knock-out

LAT:	L-type amino acid transporter
LBD:	Ligand binding domain (domaine de fixation au ligand)
LC:	Liquid chromatography
LH:	Luteinizing hormone
LOAEL:	Lowest Observed Adverse Effect Level
LOQ:	Limit of quantification
MCT:	Monocarboxylate transporter
MIT:	Monoiodotyrosine
MRM:	Multiple reaction monitoring
MRP:	Multidrug resistance-associated protein
MS:	Mass spectrometry
MTT:	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
N-coR:	Nuclear receptor corepressor
NIS:	Sodium-iodide symporter
NOAEL:	No observable adverse effect level
NTCP:	Na ⁺ /taurocholate cotransporting polypeptide
OATP:	Organic anion-transporting polypeptide
PAPS:	3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate
PB:	Phénobarbital
PBDE:	polybromodiphényléthers
PBP:	Pentabromophénol
PBS:	Phosphate buffered saline
PCB:	Polychlorobiphényles
PCN:	Pregnenolone-16alpha-carbonitrile
PCP:	Pentachlorophénol
PHAH:	Hydrocarbures aromatiques polyhalogénés
po:	<i>Per os</i>
POL II:	RNA polymerase II
PXR:	Pregnane X receptor
REACH:	Registration, evaluation and authorization of chemicals
R-TSH:	Récepteur de la thyroid-stimulating hormone
rT ₃ :	Reverse triiodothyronine
RXR:	Récepteur X des rétinoïdes
sc:	Voie sous-cutanée
SIN3:	SWI/SWF independent 3
siRNA:	Small interfering RNA

Slc16:	Solute carrier family 16
Slco:	Solute carrier organic anion transporter
SMRT:	Silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor
SNC:	Système nerveux central
SPE:	Solid phase extraction
SRC:	Steroid receptor coactivator
SULT:	Sulfotransférase
$t_{1/2}$:	Temps de demi-vie terminal
T ₁ :	Monoiodothyronine
T ₂ :	Diiodothyronine
T ₃ :	Triiodothyronine
T ₃ S:	Triiodothyronine sulfoconjuguée
T ₄ :	thyroxine
T ₄ -d ₅ :	L-thyroxine deutérée
TBBPA:	Tetrabromobisphénol A
Tetrac:	Acide tetraiodothyroacétique
Tetram:	Tetraiodothyronamine
TBG:	Thyroxine-binding globulin
TBPA:	Thyroxine-binding prealbumin
THX:	Thyroidectomisés
Tmax:	Temps pour lequel la concentration est maximale
TPO:	Thyroperoxydase
TR:	récepteurs des hormones thyroïdiennes (Thyroid receptor)
TRAP:	Thyroid hormone associated protein
TRH:	Thyrotropin-releasing hormone
Triac:	Acide triiodothyroacétique
Triam:	Triiodothyronamine
TSH:	Thyroid-stimulating hormone
TT3:	T ₃ totale (Total T ₃)
TT4:	T ₄ totale (Total T ₄)
TTR:	Transthyrétine
UDPGA:	Acide uridine 5'-diphosphoglucuronique
UGT:	UDP-glucuronosyltransférase
UPLC:	Ultra performance liquid chromatography
UV:	Ultraviolet

INTRODUCTION

Les travaux de recherche présentés dans ce document ont été réalisés au sein des équipes "Pesticides Perturbateurs Endocriniens" et "Toxicologie Intégrative et Métabolisme" de l'UMR1331 Toxalim, Research Centre in Food Toxicology, INRA, ENVT, sous la direction de Catherine Viguié et Pascal Martin. Ce projet s'inscrit dans le cadre de la réévaluation de la toxicité d'un insecticide agrovétérinaire très largement utilisé, le **fipronil**, qui peut être une **source de contamination importante de notre environnement domestique et de notre alimentation**.

Nous nous sommes plus précisément intéressés à l'impact du fipronil sur la fonction thyroïdienne. En effet, en dépit de son rôle critique sur des fonctions biologiques majeures - elle régule entre autres le développement du système nerveux central et du squelette ou le métabolisme hépatique (Yen, 2001) - l'impact des perturbateurs endocriniens sur la fonction thyroïdienne reste peu étudié. Or, on observe une augmentation de l'incidence des troubles de la fonction thyroïdienne chez l'Homme (InVS, 2011). L'incidence du cancer de la thyroïde a par exemple augmenté de 6% par an en moyenne entre 1980 et 2005 en France, et se situait respectivement au 5e et au 21e rang pour l'incidence et la mortalité par cancer chez la femme et au 19e rang pour les deux indicateurs chez l'Homme en 2005. Deux facteurs de risque établis de ces cancers sont l'exposition aux rayonnements ionisants dans l'enfance et la carence en iode. Cependant, lorsque les cancers de la thyroïde apparaissent hors des zones à risque, aucune cause étiologique particulière n'a pu être identifiée. Des facteurs nutritionnels ou hormonaux sont fortement suspectés de même qu'une exposition à des polluants environnementaux chimiques tels que les pesticides. Un de ces pesticides, le fipronil, est décrit dans les évaluations toxicologiques réglementaires comme un **perturbateur thyroïdien chez le rat** (AFSSA, 2005). Ceci a été confirmé au sein de l'équipe "Pesticides Perturbateurs Endocriniens" par Julien Leghait (2009), ses travaux ayant montré que le fipronil induit chez cette espèce une augmentation du métabolisme hépatique des hormones thyroïdiennes associée à un état d'hypothyroïdie se traduisant par une diminution des concentrations plasmatiques en thyroxine (T₄) circulante résultant en une augmentation de la sécrétion de Thyroid-Stimulating Hormone (TSH) hypophysaire.

Dans ce contexte, l'**objectif** de ce travail de thèse était alors de mieux caractériser le **mode d'action du fipronil sur la fonction thyroïdienne au niveau hépatique** en s'intéressant notamment 1) au **rôle potentiel du principal métabolite du fipronil formé *in vivo*, le fipronil sulfone**, 2) à l'**implication de récepteurs nucléaires xénosenseurs**, et 3) aux **différences interspécifiques de métabolisme du fipronil et/ou de sensibilité à la perturbation thyroïdienne** qui peuvent préjuger de la **pertinence des différents modèles animaux en termes d'analyse du risque du fipronil pour la santé humaine**.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

A. Les perturbateurs endocriniens

1. Définition

En Europe, un perturbateur endocrinien a été défini comme étant une **substance exogène altérant les fonctions du système endocrinien** et induisant des **effets nocifs** sur la santé d'un organisme intact, de ses descendants ou (sous) populations (European Workshop on the impact of endocrine disruptors on human health and wildlife, 1996). Un perturbateur endocrinien **peut interférer avec la synthèse, le stockage, la libération, la sécrétion, le transport, l'élimination ou l'action des hormones endogènes** (Comité de la prévention et de la précaution, Ministère de l'écologie et du développement durable, 2003). Pour qu'une substance soit déclarée perturbateur endocrinien, il est donc nécessaire de démontrer une altération de la fonction endocrine mais également de lui associer des conséquences délétères sur l'organisme. Les premières alertes sur les effets des polluants environnementaux sur certains organismes animaux ont été lancées au sujet de l'utilisation de dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) dans les années 1960. C'est un insecticide développé pour lutter contre les moustiques dans le cadre de la lutte contre le paludisme ou le typhus. Il est suspecté d'être responsable du déclin des populations d'oiseaux dans la région des Grands Lacs d'Amérique du Nord, idée reprise par Rachel Carlson dans son livre "Silent Spring" (1962). Il a été interdit aux Etats-Unis en 1972 et a ouvert la voie à l'étude des perturbateurs endocriniens.

2. Intérêt de l'étude des perturbateurs thyroïdiens

Probablement pour des raisons historiques car ce sont les premiers effets clairement décrits, la plupart des études étaient focalisées sur l'impact des perturbateurs endocriniens sur la fonction de reproduction. Cependant, d'autres fonctions endocriniennes, parmi lesquelles la fonction thyroïdienne, sont fondamentales pour le développement et le fonctionnement normal d'un individu. Ainsi, la fonction thyroïdienne est critique pour le maintien et le déroulement d'un certain nombre de processus biologiques, notamment au cours de **la croissance et du développement osseux**. Chez les enfants, une hypothyroïdie peut par exemple causer un retard de fermeture des épiphyses conduisant au nanisme (Yen, 2001). Les hormones thyroïdiennes jouent également un rôle essentiel lors du développement du fœtus dans la prolifération neuronale, la formation de la myéline et la migration et la différenciation cellulaires dans le **cerveau** (Porterfield and Hendry, 1998; Bernal, 2007), et régulent le développement de certains systèmes dopaminergiques et cholinergiques importants pour la mémoire et l'apprentissage (Puymirat *et al.*, 1983; Oh *et al.*, 1991). Au niveau du **cœur**, elles réduisent la résistance

vasculaire systémique, augmentent le volume sanguin, la contractilité cardiaque et la fréquence cardiaque. Au niveau du **tissu adipeux**, elles induisent la différenciation des préadipocytes du tissu adipeux blanc et sont impliquées dans le développement du tissu adipeux brun essentiel à la régulation de la thermogénèse. Au niveau du **foie**, elles stimulent entre autres les enzymes régulant la lipogénèse, la lipolyse ou les processus oxydatifs (Yen, 2001). Enfin, elles jouent un rôle dans le **développement et le fonctionnement de l'appareil reproducteur**. Chez l'homme, elles contrôlent la différenciation des cellules de Sertoli pendant les périodes périnatale et prépubère. Une hypothyroïdie prépubère pourra entraîner une malformation des testicules alors que l'hypothyroïdie ou l'hyperthyroïdie n'auront aucun impact sur la fonction des gonades chez l'adulte (Jannini *et al.*, 1995). Chez la femme, elles n'auraient pas ou peu d'effet sur le développement de l'appareil reproducteur (Choksi *et al.*, 2003). Cependant, l'hypothyroïdie prépubère est associée à un allongement de la durée du cycle menstruel et une hypothyroïdie sévère peut conduire à l'absence d'ovulation. L'hyperthyroïdie réduit la longueur du cycle menstruel et l'abondance des menstruations et augmente les niveaux de Luteinizing Hormone (LH) et de Follicle-Stimulating Hormone (FSH, Krassas, 2000). L'étude de l'impact des perturbateurs endocriniens sur la fonction thyroïdienne représente donc un **enjeu majeur en termes de santé humaine**. Ils peuvent agir à tous les niveaux de régulation de la fonction thyroïdienne (figure 1, d'après Patrick, 2009).

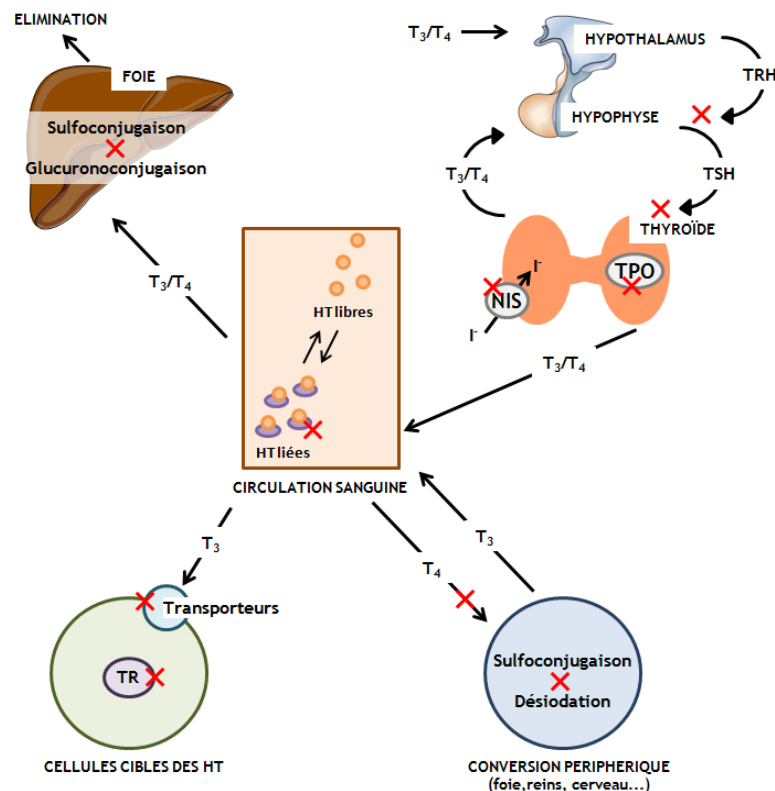


Figure 1: Effets potentiels des perturbateurs thyroïdiens sur la synthèse, le transport, le métabolisme et le mode d'action des hormones thyroïdiennes.

B. Perturbateurs thyroïdiens et synthèse des hormones thyroïdiennes

1. Perturbation de la production des hormones thyroïdiennes

a. La production des hormones thyroïdiennes

La glande thyroïde est constituée d'un **stroma conjonctif** et d'unités fonctionnelles, les **follicules**. Ces derniers sont composés de cellules folliculaires ou **thyrocytes** et d'une substance **colloïde** riche en thyroglobuline. Les follicules sont à l'origine de la formation des hormones thyroïdiennes thyroxine (T_4) et triiodothyronine (T_3) présentées en figure 2.

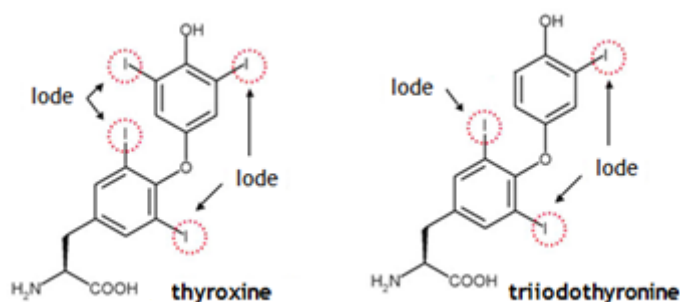


Figure 2: Structure des hormones thyroïdiennes thyroxine (T_4) et triiodothyronine (T_3).

Ces hormones thyroïdiennes étant des molécules iodées, le follicule doit incorporer de l'**iode** pour pouvoir former de la thyroxine et de la triiodothyronine. Cet iode provient essentiellement de l'alimentation mais aussi de l'iode endogène libéré par le métabolisme des hormones thyroïdiennes (Larsen *et al.*, 2002). Il pénètre sous forme d'ions iodure dans les thyrocytes au pôle basal par un transport actif via le **transporteur membranaire NIS** (Sodium-Iodide Symporter). Les ions iodure sont ensuite oxydés grâce à la **protéine héminique TPO** (Thyropéroxydase) en présence d' H_2O_2 et l'iode ainsi oxydé permet une iodation des **résidus tyrosine de la glycoprotéine thyroglobuline** présente dans la substance colloïde des follicules thyroïdiens. Cela conduit à la formation des **iodotyrosines MIT** (monoiodotyrosine) et **DIT** (diiodotyrosine) présentées en figure 3.

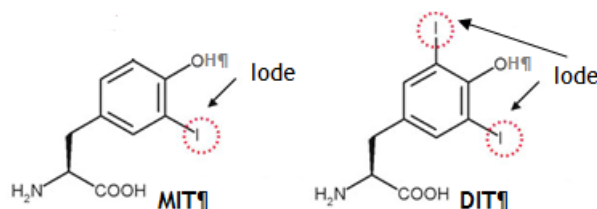


Figure 3: Structure des iodotyrosines MIT (monoiodotyrosine) et DIT (diiodotyrosine).

Le **couplage**, catalysé par la TPO, d'une MIT et d'une DIT conduit à la formation de T_3 et celui de deux DIT à la formation de T_4 . La substance colloïde, contenant les hormones thyroïdiennes fixées sur la thyroglobuline, subit ensuite une **endocytose** au niveau apical

des thyrocytes via une macropinocytose par des pseudopodes ou via une micropinocytose par la formation de petites cellules vésiculaires. La fusion de ces "gouttelettes de colloïde" entraîne la formation de **phagolysosomes** qui transportent les hormones thyroïdiennes jusqu'au pôle basal des thyrocytes. Enfin, une protéolyse de la thyroglobuline entraîne la libération des hormones thyroïdiennes T_4 et T_3 dans la circulation sanguine. Les iodotyrosines sont quant à elles désiodées par la protéine **DEHAL** (iodotyrosine déhalogénase) et l'iode est recyclé pour la formation de nouvelles hormones thyroïdiennes.

Un schéma récapitulant les différentes étapes de la production des hormones thyroïdiennes est présenté en figure 4.

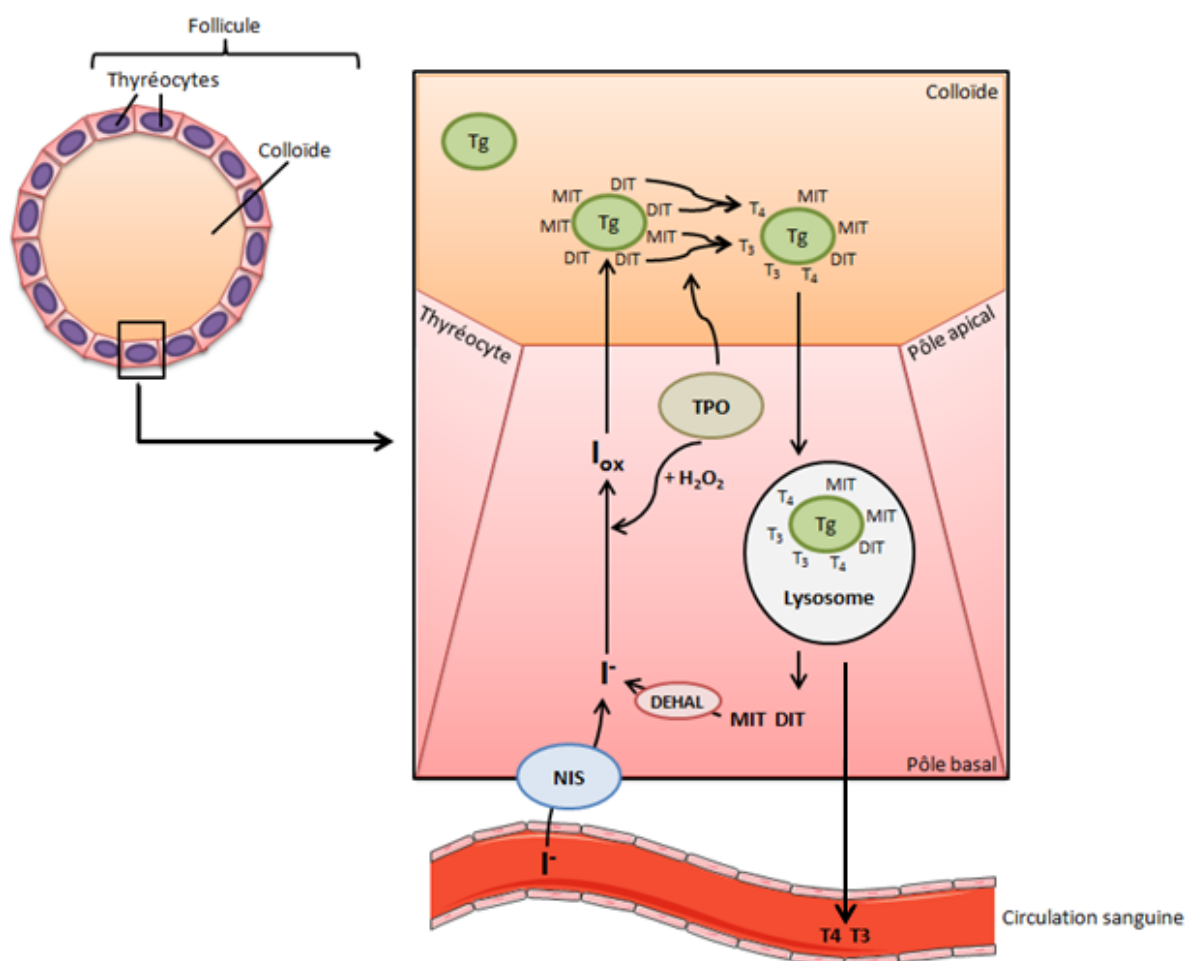


Figure 4: Production des hormones thyroïdiennes par les follicules thyroïdiens.

NIS: Sodium-Iodide Symporter, I: iode, TPO: Thyroperoxydase, Tg: Thyroglobuline, DEHAL: Iodotyrosine déhalogénase, MIT: monoiodotyrosine, DIT: diiodotyrosine, T_4 : thyroxine, T_3 : triiodothyronine. D'après Larsen *et al.*, 2002.

b. Inhibition de la captation de l'iode

Certains perturbateurs endocriniens comme le **perchlorate**, le **thiocyanate**, les **bromates** ou les **nitrites** inhibent la captation d'iode par le NIS au niveau de la thyroïde (Patrick, 2009). Le perchlorate a été développé pour faciliter la propulsion des missiles,

comme composant des feux d'artifices, de certains détergents, de certains engrais ou pour traiter les dysfonctionnements de la thyroïde induits lors d'un traitement de patients à l'amiodarone (Trumpolt, 2005). Il bloque l'entrée d'iode dans la thyroïde par **inhibition compétitive du NIS** et réduit ainsi la synthèse des hormones thyroïdiennes, mais il n'a aucun effet sur l'iodation de la thyroglobuline (Wolff, 1998). Le thiocyanate, les nitrates et les bromates agissent selon le même mode d'action que le perchlorate (Dohán *et al.*, 2003; Tonacchera, 2004) mais la capacité du perchlorate à inhiber le NIS est respectivement 15 et 240 fois plus grande que celle du thiocyanate ou du nitrate. De plus, il n'y a aucune évidence d'une synergie entre ces trois composés, ce qui confirme leur mécanisme d'action par inhibition compétitive du NIS. Des substances naturelles comme les **glucosinolates** contenus dans les crucifères comme le chou, le colza, le raifort ou le radis peuvent également inhiber la captation de l'iode (Vierling, 2008). A l'inverse, certains **phthalates**, utilisés dans les plastiques, **augmentent faiblement l'expression des ARNm et l'activité du NIS** et entraînent une hyperactivité de la thyroïde (Breous *et al.*, 2005).

c. Inhibition de la thyroperoxydase

Des substances chimiques tels que l'herbicide **amitrazole**, les fongicides **éthylénethiourée** et **mancozeb** ou la **benzophénone 2** utilisée dans les crèmes solaires (Patrick, 2009), ainsi que le **propylthiouracil** et le **méthimazole** utilisés pour le traitement de l'hyperthyroïdie (Glastein, 2009), **inhibent la TPO** et altèrent ainsi la capacité des cellules folliculaires de la thyroïde à produire de la T_4 et de la T_3 . Des substances naturelles comme les **isoflavones du soja** (Patrick, 2009) et les **flavonoïdes** en général (Divi and Doerge, 1996) inhibent également la synthèse des hormones thyroïdiennes. Elles n'ont pas toutes le même mécanisme d'action, la myricétine (raisins, baies, noix) et la naringine (pamplemousse, pomélo, bergamote) bloquant par exemple l'iodation des résidus tyrosine de la thyroglobuline mais également l'apport d' H_2O_2 essentiel au fonctionnement de la TPO, alors que la biochanine A (pois chiche) ne bloque que l'iodation de la thyroglobuline.

2. Perturbation du rétrocontrôle négatif

a. Une régulation hypothalamo-hypophysaire

La **TRH** (Thyrotropin-Releasing Hormone) est un tripeptide exprimé dans l'**hypothalamus**, les cellules "C" de la glande thyroïde qui produisent de la calcitonine, les cellules bêta du pancréas, le myocarde, les organes reproducteurs (prostate et testicules) et la moelle épinière (Larsen *et al.*, 2002) ou le tractus gastro-intestinal (Mason *et al.*, 1995). La TRH hypothalamique est produite par un cluster de cellules nerveuses dans la

région parvocellulaire du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus et est ensuite libérée dans le système porte hypothalamo-hypophysaire. Elle se fixe alors à son récepteur transmembranaire au niveau des cellules thyrotropes de l'antéhypophyse pour réguler la synthèse et la sécrétion de TSH (Thyroid-Stimulating Hormone) hypophysaire.

La **TSH** produite par l'**antéhypophyse** est une glycoprotéine composée d'une sous-unité α de 92 acides aminés commune à celle d'autres hormones sécrétées par l'hypophyse comme la LH, la FSH ou l'hormone placentaire HCG (Human Chorionic Gonadotropin) et d'une sous-unité β spécifique de 118 acides aminés. Elle se fixe à son récepteur transmembranaire au niveau des thyrocytes et contrôle la synthèse et la libération des hormones thyroïdiennes en agissant sur le transporteur d'iode NIS, sur la synthèse, l'hydrolyse et le niveau d'iodation de la thyroglobuline et sur l'expression et la synthèse de la thyroperoxydase.

Enfin, il existe un **rétrocontrôle négatif des hormones thyroïdiennes** sur la libération de TRH et de TSH. Pour exercer ce rétrocontrôle, la T_3 , hormone thyroïdienne active, se fixe préférentiellement sur l'isoforme β_2 des récepteurs aux hormones thyroïdiennes fortement exprimée au niveau des cellules thyrotropes et dans les neurones à TRH de l'hypothalamus (Abel *et al.*, 2001).

b. Inhibition de la libération des hormones thyroïdiennes

La **liaison de la TRH** au niveau des cellules thyrotropes de l'hypophyse et celle de la **TSH** au niveau des thyrocytes sont aussi modulées par les perturbateurs thyroïdiens. Le mécanisme d'action de ces perturbateurs pourrait être une **inhibition compétitive des récepteurs à la TRH ou à la TSH**. De plus, il est envisageable que des xénobiotiques interfèrent avec les voies de signalisation de ces récepteurs inhibant ainsi les effets stimulateurs de la TRH ou de la TSH sur la synthèse des hormones thyroïdiennes sans se lier aux récepteurs (Patrick, 2009). Le **DDT**, l'**Aroclor 1254** ou la "**mélisse officinale**" inhibent par exemple l'activité de l'adénylate cyclase ou la production de l'AMP cyclique impliqués dans la voie de signalisation de libération des hormones thyroïdiennes et normalement stimulés par la TSH. La "**mélisse officinale**" inhibe également la liaison de la TSH à son récepteur (Santini *et al.*, 2003).

C. Perturbateurs thyroïdiens et transport des hormones thyroïdiennes

1. Perturbation du transport plasmatique des hormones thyroïdiennes

Une fois libérées dans la circulation générale, les hormones thyroïdiennes existent sous une **forme libre ou active** et sous une **forme liée** à des protéines plasmatiques. La forme liée constitue une réserve importante d'hormones thyroïdiennes inactives (99.9% des hormones thyroïdiennes sont sous cette forme). Les principales protéines de liaison des hormones thyroïdiennes sont la **TBG** (Thyroxine-Binding Globulin), la **TTR** (Transthyrétine) et l'**albumine**. D'autres protéines comme les lipoprotéines ou les immunoglobulines contribuent faiblement au transport plasmatique des hormones thyroïdiennes (Schussler, 2000). Le rôle physiologique de la liaison aux lipoprotéines est incertain mais ce type de liaison pourrait avoir un intérêt pour favoriser l'apport de T_4 à des tissus spécifiques (Larsen *et al.*, 2002).

a. La Thyroxine-Binding Globulin

La TBG est une glycoprotéine monomérique de 54 kDa composée de 395 acides aminés synthétisée par le foie (Flink *et al.*, 1986). Elle ne comporte qu'un seul site de liaison aux hormones thyroïdiennes (Larsen *et al.*, 2002). Sa concentration dans le sérum humain est d'environ **15 à 20 mg/L** (Power *et al.*, 2000; Larsen *et al.*, 2002; Feldt-Rasmussen and Rasmussen, 2007), une concentration beaucoup plus faible que celle des autres protéines plasmatiques de liaison des hormones thyroïdiennes. Cependant, **la TBG transporte jusqu'à 75% de la T_4 plasmatique chez l'Homme** grâce à sa forte affinité pour les hormones thyroïdiennes, en particulier pour la T_4 (Schussler, 2000).

Un changement qualitatif ou quantitatif de la TBG aura alors un fort impact sur les concentrations en T_4 et en T_3 totales dans le plasma (tableau 1). En effet, chez des patients exprimant peu la TBG, les concentrations plasmatiques totales des hormones thyroïdiennes, et en particulier celles de la T_4 , sont diminuées. Ces concentrations en hormones totales sont augmentées chez des patients surexprimant la TBG (Nicoloff *et al.*, 1972; Bhatkar *et al.*, 2004). Les concentrations en hormones thyroïdiennes libres sont quant à elles peu modifiées lors d'une modification de la quantité de TBG car la modification transitoire de la fraction libre des hormones thyroïdiennes entraîne une modification de leur rétrocontrôle négatif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire qui conduit à une modulation de la sécrétion de TSH et ainsi de la production des hormones thyroïdiennes (Larsen *et al.*, 2002).

	TT4 (ng/mL)	TT3 (ng/mL)	TSH (μUI/mL)	FT4 (pg/mL)	TBG (μg/mL)	FT4/TT4 (x 10 ⁻³)
Sains	87 (45-117)	1.44 (1.09-1.60)	3.4 (2-15.7)	10.1 (8.0-11.0)	28 (20-44.3)	0.12 (0.10-0.15)
TBG élevée	137 (130-143)	2.08 (1.99-2.23)	1.3 (0.61-1.9)	8.0 (7.0-10.0)	62 (55-69)	0.06 (0.04-0.07)
TBG faible	19 (17-21)	0.50 (0.24-0.75)	5 (2.1-7.9)	13.0 (11.0-15.0)	Non détectable	0.68 (0.65-0.70)

Tableau 1: Concentrations en hormones thyroïdiennes totales et libres dans le sérum de sujets avec une concentration en TBG normale, forte ou faible.

D'après Bhatkar *et al.*, 2004.

b. La Transthyrétine

La TTR, anciennement appelée Thyroxine-Binding Prealbumin (TBPA), est une protéine tétramérique de 55 kDa composée de quatre sous-unités identiques synthétisée majoritairement par le foie et le plexus choroïde (Schussler, 2000). Elle peut également être synthétisée par le placenta et permet alors le transfert des hormones thyroïdiennes maternelles au fœtus (Landers *et al.*, 1952). Elle comporte deux sites de liaison aux hormones thyroïdiennes. Sa concentration dans le sérum humain est de **250 à 350 mg/L** (Power *et al.*, 2000) mais son **affinité** pour les hormones thyroïdiennes est plus **faible** que celle de la TBG. Elle transporte chez l'Homme jusqu'à **20% de la T₄ plasmatique et la majorité de la T₄ du liquide cébrospinal** (Schussler, 2000; Feldt-Rasmussen and Rasmussen, 2007). Une déficience en TTR peut entraîner un syndrome néphrotique, des troubles hépatiques, une fibrose kystique ou une hypothyroïdie (Feldt-Rasmussen and Rasmussen, 2007).

c. L'albumine

L'albumine est une protéine monomérique de 66 kDa synthétisée dans le foie (Larsen *et al.*, 2002). Son **affinité** pour la T₄ et la T₃ est beaucoup plus **faible** que celles de la TBG et de la TTR et elle n'est pas spécifique des hormones thyroïdiennes, mais sa forte concentration dans le sérum humain (**40000 à 50000 mg/L**, Power *et al.*, 2000; Larsen *et al.*, 2002; Feldt-Rasmussen and Rasmussen, 2007) explique qu'elle **transporte jusqu'à 20% de la T₄ plasmatique chez l'Homme** (Larsen *et al.*, 2002).

Les caractéristiques physico-chimiques de ces trois protéines de transport chez l'Homme sont récapitulées dans le tableau 2.

	TBG	TTR	Albumine
Poids moléculaire	54 kDa	55 kDa	66 kDa
Structure	Monomère	Tétramère	Monomère
Nombre de site de liaison des HT	1	2	Plusieurs
<i>Constant d'association Ka</i>			
Pour la T ₄	1 x 10 ¹⁰	2 x 10 ⁸	1.5 x 10 ⁶
Pour la T ₃	1 x 10 ⁹	1 x 10 ⁶	2 x 10 ⁵
Concentration dans le sérum (mg/L)	15 à 21	250 à 350	40000 à 50000
Liaison de la T ₄	68 à 75%	11 à 20%	5 à 20%
Liaison de la T ₃	75 à 80%	5 à 9%	11 à 20%
Temps de demi-vie (jours)	5	2	15
Taux de dégradation (mg/j)	15	650	17000

Tableau 2: Caractéristiques physico-chimiques des protéines plasmatiques de transport des hormones thyroïdiennes chez l'Homme.

TBG: Thyroxine-Binding Globulin, TTR: Transthyrétine, HT: hormones thyroïdiennes. D'après Power *et al.*, 2000; Schussler, 2000; Larsen *et al.*, 2002; Feldt-Rasmussen and Rasmussen, 2007.

d. Différences interspécifiques

La TBG est la protéine qui transporte majoritairement les hormones thyroïdiennes chez la plupart des vertébrés. Cependant, elle est absente chez certaines espèces comme le chat, le lapin, le rat, la souris, le cochon d'inde, le pigeon ou le poulet (Kaneko, 2008) chez qui l'albumine ou la TTR transportent majoritairement les hormones thyroïdiennes. De plus, chez le rat comme chez la souris, l'absence d'expression de la TBG dépend du stade physiologique de l'animal. La TBG est exprimée au cours de la période post-natale et au cours de la sénescence mais n'est pas détectable chez le rat ou la souris adulte (Savu *et al.*, 1987; Vranckx *et al.*, 1990; Savu *et al.*, 1991), elle peut être à nouveau détectable chez le rat soumis à un régime pauvre en protéines (Rouaze-Romet *et al.*, 1992) ou durant la gestation (Zoeller, 2010).

Chez le rat ou la souris sans TBG, la fraction libre des hormones thyroïdiennes, en particulier de la T₄, est supérieure à celle observée chez l'Homme et les hormones thyroïdiennes sont plus rapidement éliminées comme le suggère leur temps de demi-vie qui est plus court chez les rongeurs que chez l'Homme (tableau 3). L'absence de TBG conduirait donc à une augmentation de l'élimination des hormones thyroïdiennes et à une augmentation de la fraction disponible pour cette élimination via une augmentation de la fraction libre. Cela suggère qu'un perturbateur thyroïdien modulant le catabolisme des hormones thyroïdiennes pourrait avoir plus d'effet sur des espèces sans TBG comme le rat et la souris que chez des espèces avec TBG comme l'Homme. La documentation des

différences interspécifiques en termes de sensibilité aux perturbations thyroïdiennes résultant d'une augmentation du catabolisme des hormones thyroïdiennes est donc une étape clé au cœur de la validation des modèles d'étude permettant d'étudier les effets de perturbateurs thyroïdiens potentiels chez l'Homme.

	Homme	Rat	Souris
<i>Concentrations plasmatiques en hormones totales (ng/mL)</i>			
TT ₄	77.7	54.3 ± 9.6	23.6 ± 4.60
TT ₃	1.2	0.69 ± 0.15	0.66 ± 0.13
<i>Concentrations plasmatiques en hormones libres (pg/mL)</i>			
FT ₄	15.5	24.1 ± 3.6	13.0 ± 1.0
FT ₃	2.6	3.74 ± 1.37	2.37 ± 0.27
<i>Fraction libre (%)</i>			
T ₄	0.02	0.04	0.06 ± 0.01
T ₃	0.3	0.54	0.35 ± 0.04
<i>Temps de demi-vie (jours)</i>			
T ₄	5 à 9	0.5 à 1	0.5 à 0.75
T ₃	1	0.25	0.45

Tableau 3: Fraction libre et temps de demi-vie des hormones thyroïdiennes chez l'Homme, le rat et la souris.

D'après Berry *et al.*, 1993; Larsen *et al.*, 2002; Baltaci *et al.*, 2004; Jahnke *et al.*, 2004.

e. Liaison compétitive avec les protéines de transport plasmatiques

Les polychlorobiphényles (PCB), certains retardateurs de flamme et le pentachlorophénol possèdent une analogie structurale avec les hormones thyroïdiennes (figure 5) leur permettant potentiellement de se lier à la TTR (Meerts *et al.*, 2000; Patrick, 2009).

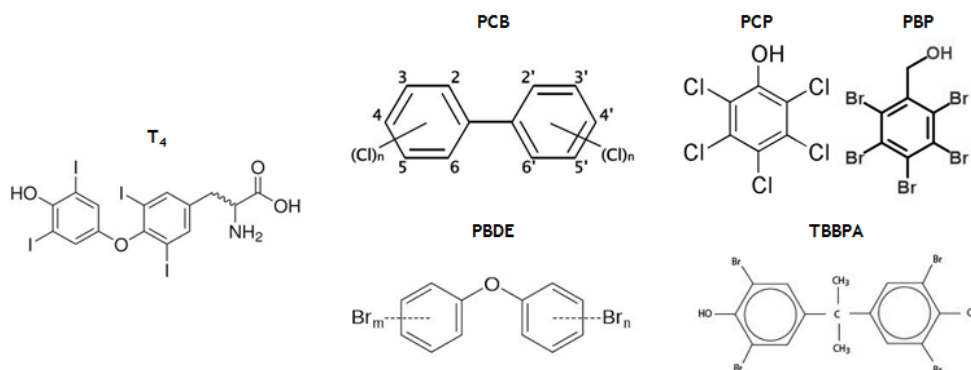


Figure 5: Analogie structurale entre la T₄ et les polychlorobiphényles (PCB), le pentachlorophénol (PCP), et les retardateurs de flamme pentabromophénol (PBP), polybromodiphényléthers (PBDE) et tetrabromobisphénol A (TBBPA).

Cette liaison faciliterait le transfert des perturbateurs thyroïdiens à travers des barrières physiologiques exprimant la TTR telles que le placenta et la barrière hémato-encéphalique et pourrait ainsi être un facteur déterminant de l'exposition du fœtus et/ou du système nerveux central. De plus, les métabolites hydroxylés des PCB possèdent une affinité pour la TTR plus importante que celle des molécules mères pouvant même être équivalente à celle de la T_4 (Cheek *et al.*, 1999; Meerts *et al.*, 2000). Enfin, les métabolites hydroxylés des perturbateurs endocriniens se liant à la TTR ne semblent pas se lier fortement à la TBG. En effet, seuls deux métabolites hydroxylés des PCB se lient à la TBG mais avec une affinité 100 fois inférieure à celle observée pour la T_4 (Lans *et al.*, 1994; Cheek *et al.*, 1999).

2. Perturbation du transport cellulaire des hormones thyroïdiennes

Les hormones thyroïdiennes agissent au niveau **intracellulaire** d'où la nécessité d'un transport des hormones thyroïdiennes à travers la membrane des cellules. Du fait de leur nature lipophile, il était supposé auparavant que le transport des hormones thyroïdiennes au travers de la bicouche lipidique des membranes cellulaires se faisait exclusivement par diffusion passive. Cependant, il est aujourd'hui démontré que les hormones thyroïdiennes pénètrent également dans les cellules grâce à des transporteurs transmembranaires. Ces transporteurs peuvent être à la fois responsables de l'influx des hormones thyroïdiennes vers les cellules mais également de leur efflux en dehors des cellules (Visser *et al.*, 2007). Ils font partie de cinq familles de transporteurs que sont les **Organic Anion-Transporting Polypeptides** (OATP), les **Multidrug Resistance-associated Proteins** (MRP), les **Monocarboxylate Transporters** (MCT), les **L-type Amino acid Transporters** (LAT) et le **Na⁺/Taurocholate Cotransporting Polypeptide** (NTCP).

a. Les Organic Anion-Transporting Polypeptides

Les OATP sont des transporteurs membranaires d'influx. La famille des OATP chez l'Homme comporte 11 membres (tableau 4). Les OATP impliqués dans le transport des hormones thyroïdiennes sont l'OATP1A2, l'OATP1B1, l'OATP1B3, l'OATP1C1 et l'OATP3A1 (Feldt-Rasmussen and Rasmussen, 2007; Visser *et al.*, 2007; van der Deure *et al.*, 2010; Kinne *et al.*, 2011; Visser *et al.*, 2011). Seul l'OATP1C1 a été décrit comme un transporteur spécifique des hormones thyroïdiennes, les autres OATP transportant une large variété de composés et ne présentant qu'une faible affinité pour les hormones thyroïdiennes. L'OATP1C1 transporte préférentiellement la T_4 et la reverse triiodothyronine (rT_3) et aurait un rôle prépondérant dans le transport de la T_4 au travers de la barrière

hémato-encéphalique. Cependant, aucune étude sur des patients avec une mutation du gène *Slco1c1* ou sur des souris déficientes en ce gène n'a été décrite, ce qui ne permet pas encore de connaître précisément la fonction de ce transporteur *in vivo* (Visser et al., 2007).

Protéine	Gène	Distribution tissulaire
OATP1A2	<i>Slco1a2</i>	Cerveau, reins, foie, intestin
OATP1B1	<i>Slco1b1</i>	Foie
OATP1B3	<i>Slco1b3</i>	Foie
OATP1C1	<i>Slco1c1</i>	Cerveau, testicules, corps ciliaire, cochlée
OATP2A1	<i>Slco2a1</i>	Ubiquitaire
OATP2B1	<i>Slco2b1</i>	Foie, placenta, intestin, cœur, peau
OATP3A1	<i>Slco3a1</i>	Ubiquitaire
OATP4A1	<i>Slco4a1</i>	Ubiquitaire
OATP4C1	<i>Slco4c1</i>	Reins
OATP5A1	<i>Slco5a1</i>	Inconnu
OATP6A1	<i>Slco6a1</i>	Testicules

Tableau 4: Localisation des OATP chez l'Homme.
D'après Kalliokoski and Niemi, 2009; Kinne *et al.*, 2011.

b. Les Multidrug Resistance-Associated Proteins

Les MRP sont des transporteurs membranaires d'efflux de la famille des protéines ABC (ATP Binding Cassette). La famille des MRP chez l'Homme comporte 8 membres (tableau 5).

Protéine	Gène	Distribution tissulaire
MRP1	<i>Abcc1</i>	Ubiquitaire mais faible dans le foie
MRP2	<i>Abcc2</i>	Foie, reins, intestin, placenta
MRP3	<i>Abcc3</i>	Foie, surrénales, pancréas, reins, intestin, placenta
MRP4	<i>Abcc4</i>	Prostate, poumons, muscles, pancréas, testicules, ovaires, vessie, vésicule biliaire
MRP5	<i>Abcc5</i>	Ubiquitaire
MRP6	<i>Abcc6</i>	Foie, reins
MRP7	<i>Abcc10</i>	Ubiquitaire
MRP8	<i>Abcc11</i>	Seins, testicules

Tableau 5: Localisation des MRP chez l'Homme.
D'après Borst *et al.*, 2000; Choi, 2005; Stavrovskaya and Stromskaya, 2008.

Les MRP jouent essentiellement un rôle dans le transport hors des cellules des glucuronides (van der Heide *et al.*, 2006). La spécificité de ces récepteurs pour les hormones thyroïdiennes est peu décrite, excepté pour les transporteurs **MRP2** et dans une moindre mesure **MRP3** (Lecureux *et al.*, 2009).

c. Les Monocarboxylate Transporters

Les MCT sont des transporteurs membranaires d'influx et d'efflux. La famille des MCT chez l'Homme comporte 14 membres (tableau 6).

Protéine	Gène	Distribution tissulaire
MCT1	<i>Slc16a1</i>	Ubiquitaire
MCT2	<i>Slc16a7</i>	Reins, cerveau
MCT3	<i>Slc16a8</i>	Épithélium rétinien pigmenté, plexus choroïde
MCT4	<i>Slc16a3</i>	Muscle squelettique, chondrocytes, leucocytes, testicules, poumons, placenta, foie
MCT5	<i>Slc16a4</i>	Cerveau, muscle, foie, reins, poumons, ovaires, placenta, cœur
MCT6	<i>Slc16a5</i>	Reins, muscles, cerveau, cœur, pancréas, prostate, poumons, placenta
MCT7	<i>Slc16a6</i>	Cerveau, pancréas, muscle
MCT8	<i>Slc16a2</i>	Foie, reins, cerveau, cœur, muscle squelettique, placenta, thyroïde, testicules, thymus, intestin, ovaires, prostate, pancréas
MCT9	<i>Slc16a9</i>	Endomètre, testicules, ovaires, seins, cerveau, reins, surrénales, rétine
MCT10 (TAT1)	<i>Slc16a10</i>	Intestin, reins, foie, muscle squelettique, cœur, placenta, pancréas
MCT11	<i>Slc16a11</i>	Peau, poumons, ovaires, seins, poumons, pancréas, épithélium rétinien pigmenté, plexus choroïde
MCT12	<i>Slc16a12</i>	Rein
MCT13	<i>Slc16a13</i>	Seins, cellules souches de la moelle osseuse
MCT14	<i>Slc16a14</i>	Cerveau, cœur, ovaires, seins, poumons, pancréas, épithélium rétinien pigmenté, plexus choroïde

Tableau 6: Localisation des MCT chez l'Homme.

D'après Halestrap and Meredith, 2004; Kinne *et al.*, 2011; Halestrap, 2012.

Les MCT impliqués dans le transport des hormones thyroïdiennes sont le **MCT8** et le **MCT10** (Feldt-Rasmussen and Rasmussen, 2007; Visser *et al.*, 2007; Heuer and Visser, 2009; van der Deure *et al.*, 2010; Kinne *et al.*, 2011). Ces deux transporteurs ont une forte spécificité vis-à-vis des hormones thyroïdiennes, en particulier vis-à-vis de la T₃. Pour ce qui est du transporteur MCT8, il est particulièrement important pour le développement du

cerveau. En effet, une mutation de ce récepteur entraîne une diminution de la captation de T_3 par les neurones et des troubles psychomoteurs (syndrome d'Allan-Herndon-Dudley, Visser *et al.*, 2007).

d. Les L-type Amino acid Transporters

Les LAT sont des transporteurs membranaires d'influx et d'efflux de la famille des transporteurs hétérodimériques des acides aminés. La famille des LAT chez l'Homme comporte 4 membres (tableau 7).

Protéine	Gène	Distribution tissulaire
LAT1	<i>Slc7a5</i>	Tumeurs, cerveau, rate, placenta, testicules, colon, reins, intestin, estomac, ovaires, thymus
LAT2	<i>Slc7a8</i>	Reins, placenta, cerveau, intestin, testicules, ovaires, foie, cœur, muscle squelettique, poumons, estomac
y+LAT1	<i>Slc7a7</i>	Reins, intestin grêle, leucocytes, poumons, érythrocytes, placenta
y+LAT2	<i>Slc7a6</i>	Cerveau, intestin grêle, testicules, parotide, cœur, reins, poumons, foie

Tableau 7: Localisation des LAT chez l'Homme.

D'après Wagner *et al.*, 2001; Kinne *et al.*, 2011.

Les LAT impliqués dans le transport des hormones thyroïdiennes sont le **LAT1** et le **LAT2** (Feldt-Rasmussen and Rasmussen, 2007; Kinne *et al.*, 2011; Visser *et al.*, 2011). Ils sont plus spécifiques de la diiodothyronine (T_2), puis de la rT_3 et de la T_3 que de la T_4 (Kinne *et al.*, 2011).

e. Le Na^+ /Taurocholate Cotransporting Polypeptide

Le **NTCP** (gène *Slco10a1* chez l'Homme et le rat) est exclusivement exprimé dans les **hépatocytes** et est un transporteur majeur des acides biliaires conjugués (Feldt-Rasmussen and Rasmussen, 2007). Il peut également transporter les hormones thyroïdiennes et en particulier leurs **métabolites sulfoconjugués** (Visser *et al.*, 2011).

f. Modulation du transport membranaire

Des perturbateurs thyroïdiens peuvent inhiber l'influx des hormones thyroïdiennes vers les cellules cibles. Certains produits chimiques comme le **di-n-butyl phthalate**, les **n-butylnbenzyl phthalate** et le **dicofol** inhibent en effet fortement la pénétration de T_3 dans les cellules (Shimada and Yamauchi, 2004). Un des mécanismes d'action de ces perturbateurs thyroïdiens est la **modulation de l'expression des ARNm et de la quantité d'OATP** au niveau des hépatocytes (Guo *et al.*, 2002; Jigorel *et al.*, 2006).

D. Perturbateurs thyroïdiens et métabolisme des hormones thyroïdiennes

1. Perturbation des enzymes responsables de la métabolisation des hormones thyroïdiennes

Le foie joue un rôle prépondérant dans le métabolisme des hormones thyroïdiennes. C'est en effet, un site majeur de sécrétion et de dégradation des protéines de transport citées plus haut mais également de conversion, de dégradation et d'excrétion des hormones thyroïdiennes (Klachko and Johnson, 1983; Kelly, 2000, figure 7).

a. Les désiodases

La désiodation est une **voie majeure** de métabolisation des hormones thyroïdiennes chez l'Homme avec jusqu'à **85% de la T_4** et **environ 50% de la T_3 et de la rT_3** métabolisées **par cette voie** (Curran and DeGroot, 1991). Trois désiodases ont été identifiées (D1, D2 et D3). Ce sont des sélénoenzymes membranaires ou du réticulum endoplasmique de 29 à 31.5 kDa (Beckett and Arthur, 2005; Bianco and Kim, 2006) qui catalysent la suppression d'un iode de la position 5 ou 5' des iodothyronines (figure 6).

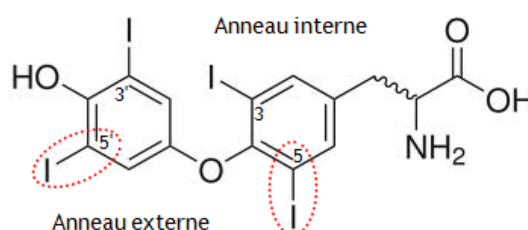


Figure 6: Sites de suppression potentielle d'un iode par les désiodases.

La **désiodase D1** peut catalyser une suppression d'iode sur l'anneau interne ou sur l'anneau externe des iodothyronines, elle est donc responsable de la formation de l'hormone thyroïdienne $3,3',5-T_3$ (forme active) à partir de la "pro-hormone" $3,3',5,5'-T_4$ (désiodation sur l'anneau externe), de $3,3',5-rT_3$ inactive à partir de $3,3',5,5'-T_4$ (désiodation sur l'anneau interne) et de $3,3'-T_2$ inactive à partir de $3,3',5-T_3$ (désiodation sur l'anneau interne) ou de $3,3',5-rT_3$ (désiodation sur l'anneau externe). Elle catalyse également la désiodation de la T_3 sulfoconjuguée. La **désiodase D2** ne catalyse qu'une suppression d'iode sur l'anneau externe des iodothyronines et est responsable de la formation de $3,3',5-T_3$ à partir de $3,3',5,5'-T_4$ et de $3,3'-T_2$ à partir de $3,3',5-rT_3$. La **désiodase D3** ne catalyse qu'une suppression d'iode sur l'anneau interne et est responsable de la formation de $3,3',5-rT_3$ à partir de $3,3',5,5'-T_4$ et de $3,3'-T_2$ à partir de $3,3',5-T_3$.

Ces trois désiodases diffèrent par leur spécificité de substrat et leur distribution tissulaire (tableau 8), mais également suivant l'âge, l'espèce, le régime alimentaire, et le statut hormonal (Bianco and Kim, 2006).

	D1	D2	D3
Poids moléculaire	29 kDa	30.5 kDa	31.5 kDa
Substrats	rT ₃ , T ₃ S, T ₄ , T ₃	T ₄ , rT ₃	T ₃ , T ₄
Km apparent (M)	10 ⁻⁷ - 10 ⁻⁶	10 ⁻⁹	10 ⁻⁹
Temps de demi-vie	Quelques heures	Environ 20 minutes	Quelques heures
Localisation cellulaire	Membrane plasmique	Réticulum endoplasmique	Membrane plasmique
Distribution tissulaire	Foie, reins, thyroïde, hypophyse	SNC, hypophyse, tissu adipeux brun, placenta, thyroïde, cœur, moelle épinière	Placenta, SNC, peau, foie du fœtus

Tableau 8: Propriétés biochimiques et distribution tissulaire des désiodases chez l'Homme.
rT₃: reverse-triiodothyronine, T₃: triiodothyronine; T₄: thyroxine, T₃S: T₃ sulfoconjuguée, SNC: système nerveux central. D'après Beckett and Arthur, 2005; Bianco and Kim, 2006.

b. Les enzymes de conjugaison

La conjugaison des hormones thyroïdiennes est effectuée par des UGT (UDP-glucuronosyltransférases) microsomales et des SULT (sulfotransférases) cytosoliques. Elle a pour but d'augmenter la solubilité dans l'eau des hormones thyroïdiennes et ainsi de faciliter leur excrétion rénale et biliaire (Watkins and Klaassen, 1983; Gamage *et al.*, 2006).

La **glucuronoconjugaison** a majoritairement lieu dans le foie. C'est une voie importante de métabolisation de la T₄ chez le rat alors que la capacité de glucuronoconjugaison du foie humain est controversé. Chez le rat, environ 25% d'une dose de T₄ administrée par voie orale est excrétée en 24h via la bile dont 50% sous forme glucuronoconjuguée (Curran and DeGroot, 1991). La glucuronoconjugaison de la T₃ est moins importante que la glucuronidation de la T₄ chez le rat et serait quasi inexistante chez l'Homme (Wu *et al.*, 2005). Des métabolites de la T₄ ou de la T₃ comme l'acide tetraiodothyroacétique (Tetrac), l'acide triiodothyroacétique (Triac), la rT₃ ou la T₂ peuvent également être glucuronoconjugués. Aucune désiodation des molécules conjuguées n'est décrite (Curran and DeGroot, 1991).

Chez l'Homme, quatre familles d'UGT ont été identifiées: UGT1, UGT2, UGT3 et UGT8. Elles sont localisées majoritairement dans le foie mais on en trouve également dans l'intestin, les reins, le cerveau, le pancréas, le placenta ou l'épithélium nasal. Seules les

familles UGT1 et UGT2 utilisent de l'acide uridine 5'-diphosphoglucuronique (UDPGA) comme cofacteur pour glucuronoconjuguer leurs substrats (Jancova *et al.*, 2010). Ce sont ces deux familles d'UGT qui sont responsables de la glucuronidation des hormones thyroïdiennes, les UGT1 qui conjuguent préférentiellement la bilirubine et les phénols étant plus spécifiques de la T_4 et de la rT_3 et les UGT2 qui conjuguent préférentiellement l'androstérone étant plus spécifiques de la T_3 (Visser *et al.*, 1993a). Il existe des différences interspécifiques en ce qui concerne les isoformes qui conjuguent préférentiellement les hormones thyroïdiennes. La T_4 et la rT_3 sont par exemple considérées comme étant majoritairement conjuguées par les isoformes UGT1A1 et UGT1A6 chez le rat et par les isoformes UGT1A1 et UGT1A9 chez l'Homme (Emi *et al.*, 2007).

La **sulfoconjugaison** a également majoritairement lieu dans le foie. A l'inverse de la glucuronoconjugaison, il y a une relation étroite entre la sulfoconjugaison et la désiodation. En effet, les désiodases peuvent métaboliser les produits sulfoconjugués et sembleraient même avoir une plus grande affinité pour les produits sulfoconjugués que pour les hormones thyroïdiennes natives. Le taux de désiodation sur l'anneau interne de la T_{3S} serait par exemple 30 fois plus élevé que celui de la T_3 . Enfin, les sulfotransférases catalysent préférentiellement la conjugaison de la $3,3'$ - T_2 formée par désiodation et celle de la $3'$ - T_1 (monoiodothyronine) plutôt que celle de la T_3 ou encore de la T_4 et de la rT_3 majoritairement glucuronoconjuguées (Curran and DeGroot, 1991).

Chez l'Homme et chez le rat, trois familles de SULT ont été identifiées: SULT1, SULT2 et SULT3/4 (Wu *et al.*, 2005; Gamage *et al.*, 2006). Une quatrième famille a également été décrite chez l'Homme: la SULT6. Ce sont les SULT1 spécifiques des phénols et les SULT2 spécifiques des hydroxystéroïdes qui conjuguent les hormones thyroïdiennes (Wu *et al.*, 2005). Chez l'Homme, les isoformes des SULT1 sont exprimées dans le foie, le cerveau, les seins, l'intestin, le jéjunum, les poumons, les surrénales, l'endomètre, le placenta, les reins et les plaquettes sanguines. La SULT2A1 est exprimée dans le foie, les surrénales du fœtus et de l'adulte, le duodénum et les isoformes des SULT2B dans la prostate, le placenta, les surrénales, les ovaires, les poumons, les reins et le colon. La SULT4A1 a seulement été identifiée dans le cerveau et la SULT6B1 dans les testicules et les reins. Le PAPS (3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate), synthétisé dans tous les tissus chez les mammifères, est le donneur universel du groupement sulfate pour toutes les réactions de sulfoconjugaison quelle que soit l'isoforme des SULT impliquée (Jancova *et al.*, 2010). Il existe des différences interspécifiques et entre sexes en ce qui concerne les isoformes qui conjuguent les hormones thyroïdiennes. L'isoforme SULT1C1 joue par exemple un rôle important dans la sulfoconjugaison des hormones thyroïdiennes chez le rat mâle alors que

ce sera plutôt l'isoforme SULT1B1 chez le rat femelle ou l'isoforme SULT1A1 chez l'Homme (Visser *et al.*, 1998).

c. Clivage de la liaison éther

Le clivage de la liaison éther de la T_4 ou de la T_3 consiste en la **rupture du noyau thyronine au niveau de sa liaison éther** afin de libérer une **diiodotyrosine** à partir de l'anneau interne et une quinone après désiodation de l'anneau externe (Oziol *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2005). Cette réaction serait catalysée par une peroxydase, probablement en présence d' H_2O_2 (Burger *et al.*, 1983; Kubota *et al.*, 1985). Chez l'Homme sain, le clivage de la liaison éther serait une voie métabolique des hormones thyroïdiennes de faible importance, la proportion de DIT rejoignant le plasma provenant plutôt de la thyroïde et de l'hydrolyse de la thyroglobuline. Le clivage de la liaison éther pourrait être plus important chez le rat, ou chez l'Homme dans certaines conditions pathologiques associées à une leucocytose élevée (Schoenmakers, 1994). Enfin, la présence d'une source extrathyroïdienne de monoiodotyrosine provenant de la désiodation de la diiodotyrosine a été suggérée chez l'Homme (Tan *et al.*, 1990).

d. Désamination et décarboxylation

La **désamination** de la T_4 et de la T_3 conduit à la formation de l'acide tetraiodothyroacétique (**Tetrac**) et de l'acide triiodothyroacétique (**Triac**) grâce à la thyroid hormone aminotransferase, transaminase localisée dans le foie et dans les reins, ou à la L-amino acid oxidase localisée dans les reins chez les mammifères. Les métabolites de la T_4 et de la T_3 comme la T_2 ne sont pas soumis à cette désamination, à l'exception de la rT_3 qui donne un reverse Triac. Les Tetrac et Triac peuvent être désiodés, glucuronoconjugués ou sulfoconjugués. Par exemple, chez le rat, la glucuronidation est la voie de métabolisation majeure des Triac. Enfin, les Tetrac et les Triac ont une activité thyromimétique du fait de leur capacité à se lier aux récepteurs des hormones thyroïdiennes se traduisant par une capacité à moduler la sécrétion de TSH, les Triac étant même plus efficaces que la Lévothyroxine pour traiter certains goitres (Wu *et al.*, 2005). Cependant, l'importance de cette voie de métabolisation reste mineure en conditions physiologiques car la production totale de Tetrac et de Triac correspond à une voie d'élimination de moins de 2 % de la T_4 produite chaque jour (Curran and DeGroot, 1991).

La **décarboxylation** de la T_4 et de la T_3 conduit à la formation de la tetraiodothyronamine (**Tetram**) et de la triiodothyronamine (**Triam**) grâce à une décarboxylase encore inconnue. Le rôle de ces Tetram et Triam est actuellement peu connu. Cependant, la 3-iodothyronamine serait la plus puissante des iodothyronamines et

aurait un rôle antagoniste à celui de la T_3 en réduisant par exemple la température corporelle et la fréquence cardiaque (Wu *et al.*, 2005; Hoefig *et al.*, 2012).

e. Bilan des voies de métabolisation des hormones thyroïdiennes

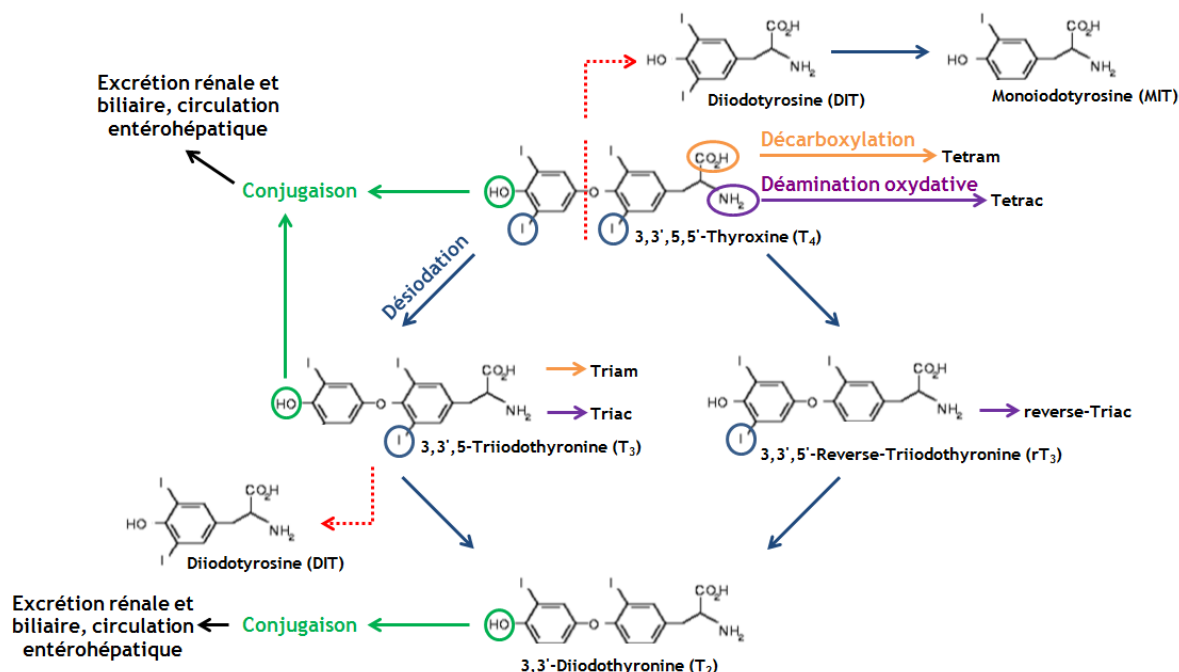


Figure 7: Les voies de métabolisation des hormones thyroïdiennes

f. Modulation de la métabolisation des hormones thyroïdiennes

La désiodase **D1** peut être inhibée par le **propylthiouracil**. La **D2** est modulée par les **PCB**, ce qui modifie les niveaux de T_3 et interfère par exemple avec le développement de la cochlée ou oreille interne chez le fœtus. Une **diminution de la synthèse périphérique de T_3** a également été montrée lors d'une altération de l'activité des désiodases par l'**érythrosine**, l'**ocylmethoxycinnamate** utilisé dans les crèmes solaires, le pesticide **methoxychlore**, le **plomb** et le **cadmium** (Patrick, 2009).

Les **PBDE** et les **hydrocarbures aromatiques polyhalogénés (PHAH)** réduisent la concentration plasmatique en T_4 par une **augmentation de la glucuronoconjugaison** de la T_4 dans le foie. Les **PCB** peuvent également induire les **UGT** hépatiques et ainsi augmenter l'élimination de la T_4 via une activation du récepteur nucléaire AhR (Kashiwagi *et al.*, 2009). L'activité des **sulfotransférases** peut quant à elle être inhibée par les **PCB**, le **triclosan**, le **pentachlorophénol** et les **dioxines**, ce qui induit une modification des niveaux en T_3 et en T_4 périphériques critique compte-tenu du rôle de ces enzymes au niveau du cerveau, de l'utérus, de la glande mammaire et de l'intestin (Patrick, 2009).

2. Une régulation du métabolisme via des récepteurs nucléaires xénosenseurs

a. Structure et fonctionnement des récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires sont des facteurs de transcription. Tous les récepteurs nucléaires ont une structure commune composée d'un **domaine de liaison à l'ADN (DBD)** qui permet au récepteur de se fixer sur une séquence de l'ADN constituant un élément de réponse spécifique et un **domaine de liaison au ligand (LBD)** localisé dans la partie C-terminale du récepteur qui reconnaît des ligands spécifiques hormonaux ou non (figure 8).

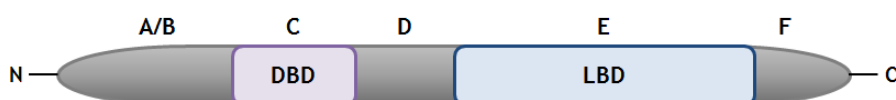


Figure 8: Structure des récepteurs nucléaires.

A/B: région N-terminale, C: DBD, domaine de liaison à l'ADN, D: région "charnière", E: LBD, domaine de liaison au ligand, F: région C-terminale. D'après Mangelsdorf *et al.*, 1995; Olefsky *et al.*, 2001.

Le DBD comporte deux "doigts de zinc", ce qui différencie les récepteurs nucléaires des autres protéines qui se lient à l'ADN. Les récepteurs nucléaires peuvent être classés dans 4 groupes en fonction de leurs ligands, de l'élément de réponse du DBD sur lequel ils se fixent (séquence de nucléotides répétée dans le sens direct ou indirect) et de leur fonctionnement sous forme d'homodimère, d'hétérodimère ou de monomère (figure 9).

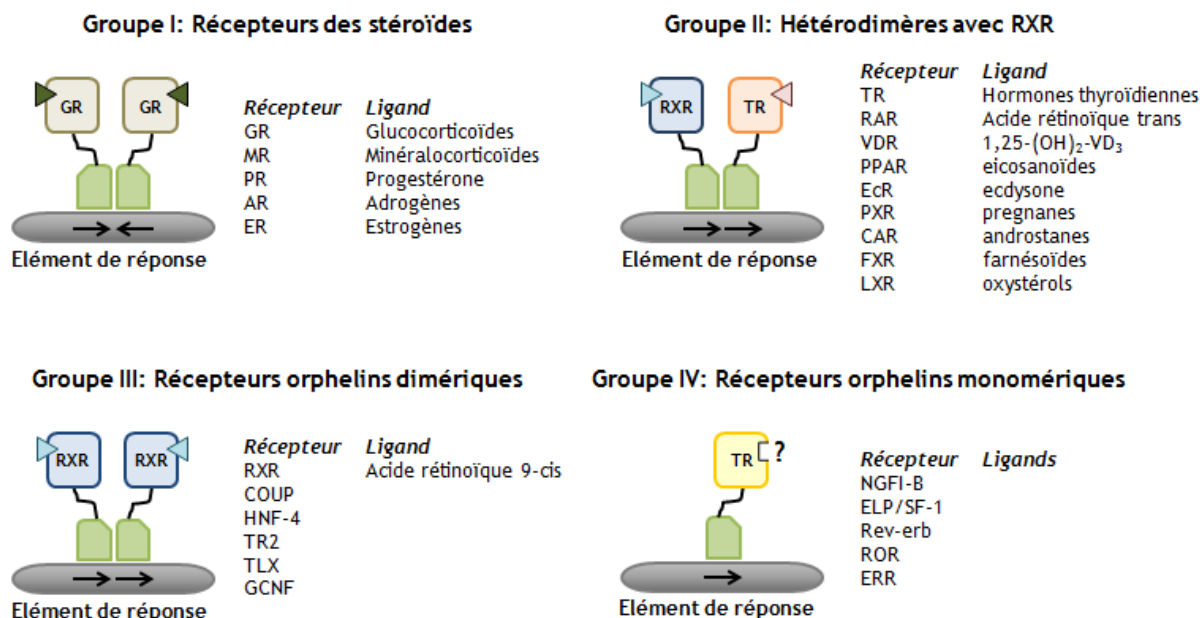


Figure 9: Les quatre groupes de récepteurs nucléaires.

D'après Mangelsdorf *et al.*, 1995; Olefsky *et al.*, 2001.

b. Récepteurs nucléaires xénosenseurs et métabolisme des hormones thyroïdiennes

Chez les mammifères, les récepteurs CAR (Constitutive Androstane Receptor) et PXR (Pregnane X Receptor) sont considérés comme des **xénosenseurs** (Handschin and Meyer, 2003). Leur fonction est de **déclencher une réponse cellulaire adaptée lors d'une exposition à des xénobiotiques** comme certains perturbateurs endocriniens (tableau 9).

Perturbateurs endocriniens		Perturbation
Stéroïdes	Acétate de cyprotérone	Androgènes
	Spironolactone	Androgènes, aldostérone, progestatif
Pesticides	Alachlor	Hormones thyroïdiennes, estrogènes, androgènes
	Chlordane	Estrogènes, androgènes
	Chlordecone	Estrogènes
	Chlorpyrifos	Estrogènes
	Cyperméthrine	Reproduction
	DDE	Androgènes
	DDT	Estrogènes, androgènes
	Dieldrin	Estrogènes, androgènes
	Endosulfan	Estrogènes, androgènes
	Lindane	Estrogènes, reproduction
	Methoxychlor	Estrogènes, androgènes
	Mono/Bis-OH-methoxychlor	Estrogènes
	Trans-nonachlor	Progestérone, estrogènes
	Trifluralin	Reproduction, métabolisme
	Vinclozolin	Androgènes
Phthalates	Acide phthalique	Androgènes
	MEHP / DEHP	Androgènes
	DBP	Estrogènes
Alkylphénol	Nonylphénol	Estrogènes
PCBs	PCBs hautement chlorés	Estrogènes
Autres	Benzophénone	Estrogènes, androgènes
	BPA	Estrogènes
	Triclosan	Androgènes

Tableau 9: Perturbateurs endocriniens connus pour être des ligands de CAR et/ou de PXR.
D'après Kretschmer and Baldwin, 2005.

En réponse à ces xénobiotiques ou à d'autres ligands endogènes ou exogènes, les récepteurs CAR et PXR entraînent une modulation d'enzymes hépatiques impliquées dans le métabolisme des hormones thyroïdiennes ou de transporteurs membranaires de ces hormones (tableau 10).

Récepteur	Ligand	Effets	Références
CAR	Phénobarbital		
	TCPOBOP	Induction UGT et SULT chez les rongeurs ou les amphibiens	Kretschmer and Baldwin, 2005
	PBDE		
	PGC-1 α (produit lors d'une restriction calorique)	Induction UGT1A1, SULT1A1 et SULT2A1 chez la souris	Maglich <i>et al.</i> , 2004
	Phénobarbital	Induction D1 chez la souris	Konno <i>et al.</i> , 2008
	PBDE	Induction UGT2B, SULT1B1, MRP2, MRP3, OATP1A2 et D1 chez le rat	Szabo <i>et al.</i> , 2009
	TCPOBOP	Induction UGT1A1, OATP1B2 chez la souris	Xie, 2008
PXR	PCN	Induction UGT1A1 et UGT1A9 chez la souris	Chen <i>et al.</i> , 2003
	PCN	Induction OATP1A2 chez la souris	Staudinger <i>et al.</i> , 2001
	PBDE	Induction MRP2, MRP3 et OATP1A2 chez le rat	Szabo <i>et al.</i> , 2009
	PCN	Induction UGT1A1, UGT1A2 et UGT1A5 chez le rat	Vansell and Klaassen, 2002

Tableau 10: Enzymes responsables du métabolisme des hormones thyroïdiennes et transporteurs membranaires modulés par les récepteurs nucléaires CAR et PXR.

Il est cependant important de noter que les modulations d'enzymes hépatiques décrites ici ne sont pas les mêmes en fonction du ligand qui active le récepteur. Or, un ligand d'un récepteur nucléaire dans une espèce ne l'est pas toujours dans une autre espèce et n'aura donc pas le même effet sur les enzymes hépatiques impliquées dans le métabolisme des hormones thyroïdiennes ou sur les transporteurs membranaires de ces hormones. Un ligand pourra donc être un perturbateur thyroïdien dans une espèce et pas dans une autre. Un récapitulatif des différences interspécifiques connues pour certains ligands non endogènes de CAR et de PXR murin ou humain est présenté dans le tableau 11.

Ligand	mCAR	hCAR	mPXR	hPXR	Références
Rifampicine			Faible	X	Bertilsson <i>et al.</i> , 1998; Blumberg <i>et al.</i> , 1998; Chrencik <i>et al.</i> , 2005; Jones <i>et al.</i> , 2000; Lehmann <i>et al.</i> , 1998; Moore <i>et al.</i> , 2000b; Zhu <i>et al.</i> , 2004; Goodwin <i>et al.</i> , 1999
PCN			X	Faible	Bertilsson <i>et al.</i> , 1998; Blumberg <i>et al.</i> , 1998; Chrencik <i>et al.</i> , 2005; Jones <i>et al.</i> , 2000; Kliewer <i>et al.</i> , 1998; Lehmann <i>et al.</i> , 1998; Moore <i>et al.</i> , 2000b
Dexaméthasone			X	Faible	Kliewer <i>et al.</i> , 1998; Blumberg <i>et al.</i> , 1998; Moore <i>et al.</i> , 2000b; Lehmann <i>et al.</i> , 1998
Hyperforine			X	X	Moore <i>et al.</i> , 2000a; Watkins <i>et al.</i> , 2003b; Zhu <i>et al.</i> , 2004
TCPOBOP	X	0	0	Faible	Moore <i>et al.</i> , 2000b; Tzamelis <i>et al.</i> , 2000
CITCO	0	X			Maglich <i>et al.</i> , 2003
Clotrimazole	0	X	X	X	Bertilsson <i>et al.</i> , 1998; Jones <i>et al.</i> , 2000; Lehmann <i>et al.</i> , 1998; Maglich <i>et al.</i> , 2003; Moore <i>et al.</i> , 2000b; Zhu <i>et al.</i> , 2004; Goodwin <i>et al.</i> , 1999

Tableau 11: Ligands non endogènes de CAR et de PXR chez la souris et l'Homme.

E. Perturbateurs thyroïdiens et action des hormones thyroïdiennes

1. Perturbation des récepteurs nucléaires des hormones thyroïdiennes

Bien que les hormones thyroïdiennes soient capables d'exercer un effet sur des cibles cellulaires non nucléaires, leur effet majeur passe par la régulation de la transcription de gènes cibles via une **action au niveau de récepteurs nucléaires** (Yen, 2001).

a. Les récepteurs nucléaires des hormones thyroïdiennes

Les récepteurs nucléaires des hormones thyroïdiennes (TR) font partie du groupe II des récepteurs nucléaires (figure 9) et forment un **hétérodimère avec le récepteur RXR** (Récepteur X des Rétinoïdes). Il y a deux isoformes principales des récepteurs nucléaires aux hormones thyroïdiennes, **TR α** (ou c-erbA α) et **TR β** (ou c-erbA β), dont les gènes sont respectivement localisés sur les chromosomes 17 et 3 chez l'Homme. Ces deux isoformes existent également chez les amphibiens, le poussin, la souris et le rat (Yen, 2001).

Un épissage alternatif de l'ARN de l'isoforme TR α conduit ensuite à la formation de deux protéines distinctes: **TR α 1** et **TR α 2** ou c-erbA α 2 (Yen, 2001). Il existe également deux protéines tronquées, **TR α Δ 1** et **TR α Δ 2**. TR α 1 présente une expression ubiquitaire et est le seul des TR α qui peut fixer la T₃. TR α 2 est généralement co-exprimé avec TR α 1. Les deux protéines tronquées s'expriment exclusivement dans le cerveau, les poumons et l'intestin. TR α 2, TR α Δ 1 et TR α Δ 2 peuvent inhiber l'activité du récepteur TR α 1 (Plateroti *et al.*, 2002).

Un épissage alternatif de l'ARN de l'isoforme TR β conduit aux deux protéines **TR β 1** et **TR β 2** (Yen, 2001). Deux autres protéines pour l'isoforme TR β , **TR β 3** et la protéine tronquée **TR β Δ 3**, ont été également récemment identifiées chez le rat. TR β 1 présente une expression ubiquitaire, TR β 2 s'exprime seulement au niveau du système nerveux central et périphérique (cerveau, cervelet, hypophyse, hypothalamus, rétine et nerfs sensoriels), TR β 3 est exprimé majoritairement dans les reins, le foie et les poumons et TR β Δ 3 dans les poumons et la rate. La protéine tronquée TR β Δ 3 ne se lie pas à l'ADN mais peut fixer la T₃, elle joue alors un rôle antagoniste aux autres protéines TR β (Plateroti *et al.*, 2002).

Pour déterminer le rôle des TR, des études ont été menées sur des souris déficientes pour les différentes isoformes. Les résultats de ces études sont présentés dans le tableau 12.

Paramètre	Effets	Souris	Référence
Croissance	Réduite et mort	TR $\alpha^{-/-}$, TR $\alpha^{-/-}$ /TR $\beta^{-/-}$	Gauthier <i>et al.</i> , 1999
Maturation osseuse	Réduction du développement des centres épiphysaires	TR $\alpha^{-/-}$, TR $\alpha^{-/-}$ /TR $\beta^{-/-}$	Gauthier <i>et al.</i> , 1999 Fraichard <i>et al.</i> , 1997
Organes	Réduction de la taille du foie, du cœur, des poumons et des reins	TR $\alpha^{-/-}$ /TR $\beta^{-/-}$	Gauthier <i>et al.</i> , 1999
	Altération de l'intestin	TR $\alpha^{-/-}$, TR $\alpha^{-/-}$ /TR $\beta^{-/-}$	Gauthier <i>et al.</i> , 1999
TSH	Augmentation	TR $\beta^{-/-}$, TR $\alpha^{-/-}$ /TR $\beta^{-/-}$	Gauthier <i>et al.</i> , 1999 Forrest <i>et al.</i> , 1996 Weiss <i>et al.</i> , 1998
T ₄ et T ₃	Augmentation	TR $\beta^{-/-}$, TR $\alpha^{-/-}$ /TR $\beta^{-/-}$	Gauthier <i>et al.</i> , 1999 Forrest <i>et al.</i> , 1996 Weiss <i>et al.</i> , 1998
	Réduction	TR $\alpha^{-/-}$	Fraichard <i>et al.</i> , 1997
Thyroïde	Hyperplasie	TR $\beta^{-/-}$, TR $\alpha^{-/-}$ /TR $\beta^{-/-}$	Gauthier <i>et al.</i> , 1999
	Hypoplasie	TR $\alpha^{-/-}$	Gauthier <i>et al.</i> , 1999

Tableau 12: Modifications physiologiques observées chez des souris déficientes pour les différents isoformes des récepteurs nucléaires des hormones thyroïdiennes.

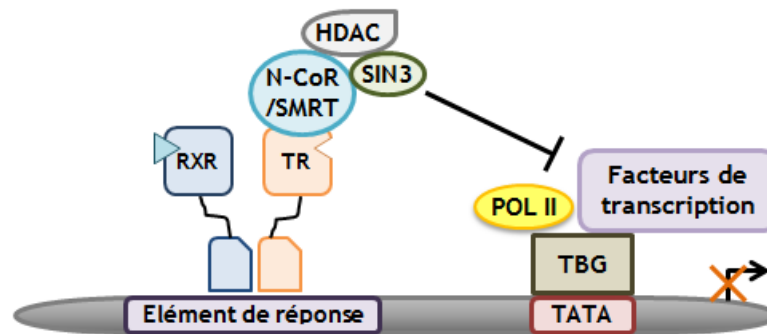
Ces études suggèrent que les TR α et TR β sont différenciellement impliqués dans le contrôle de la production de TSH et dans le contrôle du développement et des processus métaboliques et endocriniens. D'un côté, ils interagissent pour le contrôle de certaines fonctions, comme le contrôle de la production de TSH. En effet, les concentrations plasmatiques en TSH sont déjà augmentées chez les souris TR $\beta^{-/-}$ et encore plus chez les souris déficientes pour les TR α et TR β . D'un autre côté, ils ont des rôles distincts dans certains tissus, les souris TR $\alpha^{-/-}$ et TR $\alpha^{-/-}$ /TR $\beta^{-/-}$ présentant le même défaut de maturation osseuse alors que les TR $\beta^{-/-}$ présentent un développement des centres épiphysaires du tibia équivalent à celui de souris sauvages.

b. Corépresseurs et coactivateurs

Les récepteurs nucléaires des hormones thyroïdiennes sont fixés en permanence à leur élément de réponse. Ils ont la particularité de pouvoir réprimer ou activer la transcription de gènes cibles selon qu'ils ont fixé la T₃ ou non (Plateroti *et al.*, 2002). En l'absence d'hormone, les TR fixent les corépresseurs N-CoR (nuclear receptor corepressor) et SMRT (silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor). Ceux-ci sont associés à un complexe protéique HDAC (histone deacetylase)/SIN3 (SWI/SWF

independent 3) qui conduit à désacétyler la chromatine environnante en la rendant inactive. Lors de la **fixation de la T_3** , la conformation du récepteur nucléaire des hormones thyroïdiennes change, ce qui déstabilise la liaison des corépresseurs et favorise la liaison de **coactivateurs possédant une activité acétyltransférase** (complexe SRC (steroid receptor coactivator)/p160 - CBP (CREB-binding protein)/p300). Ceci facilite alors la fixation du complexe **TRAP220/DRIP205** (thyroid hormone associated protein/vitamin D receptor interacting protein) responsable du recrutement de **POL II** (RNA polymerase II) et des **facteurs de transcription** permettant la transcription des gènes cibles (figure 10).

Corépression



Coactivation

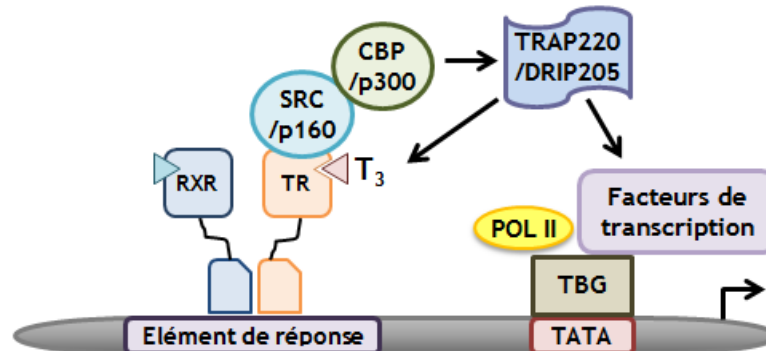


Figure 10: Corépresseurs et coactivateurs des récepteurs nucléaires des hormones thyroïdiennes.

D'après Ito and Roeder, 2001; Yen, 2001; Lazar, 2003.

c. Modulation de l'activité des récepteurs nucléaires des hormones thyroïdiennes par des contaminants

Le **bisphénol A** inhibe la **liaison de la T_3 aux récepteurs nucléaires des hormones thyroïdiennes** et, par le recrutement du **corépresseur N-CoR**, supprime la transcription *in vitro*. Il a été décrit comme un **antagoniste de la T_3 in vivo** à partir de différents modèles d'amphibiens (Fini *et al.*, 2007; Heimeier *et al.*, 2009; Kashiwagi *et al.*, 2009; Heimeier et

Shi, 2010). Enfin, les **PCB**, les **PBDE**, leurs **métabolites halogénés** et probablement les **polybromobiphényles** et les **phthalates** se lient aussi aux **TR** et pourraient ainsi avoir un effet sur leur fonctionnement (Zoeller, 2005).

2. Le cas particulier des récepteurs mitochondriaux

Deux récepteurs des hormones thyroïdiennes ont été décrits dans les **mitochondries** du foie de rat: **p43** (43 kDa) et **p28** (28 kDa) (Wrutniak-Cabello *et al.*, 2001). Ils sont issus d'un épissage alternatif de l'isoforme TR α . Les récepteurs TR α 1, TR α 2, p43 et p28 ont également été identifiés dans les mitochondries des cardiomyocytes (Psarra and Sekeris, 2008). **La liaison de la T₃ ou de la T₂ au niveau de la mitochondrie entraine une réponse plus rapide** que lors de la liaison de la T₃ aux récepteurs nucléaires des hormones thyroïdiennes et favoriserait majoritairement une régulation de la thermogénèse et du métabolisme oxydatif. En effet, le récepteur p43 serait fortement exprimé dans les mitochondries du tissu adipeux brun et à l'inverse très peu exprimé dans le cerveau qui n'est pas considéré comme impliqué dans l'effet calorigénique des hormones thyroïdiennes. Ces récepteurs mitochondriaux pourraient également être impliqués dans les phénomènes d'apoptose, dans l'arrêt ou la réduction de la prolifération de différentes lignées cellulaires, et dans la différenciation de certaines cellules comme les myoblastes (Wrutniak-Cabello *et al.*, 2001).

F. Le cas de l'insecticide agrovétérinaire fipronil

1. Historique et législation

Le fipronil, 5-amino-1-(2,6-dichloro-4-(trifluorométhylphényle)-4-(trifluorométhylsulfonyl) pyrazole-3-carbonitrile, CAS 120068-37-3), est une substance active de produit phytosanitaire appartenant à la famille chimique des **phénylpyrazoles**. Il a été mis au point en France par la société Rhône-Poulenc Agro entre 1985 et 1987 et mis sur le marché en 1993. Il a été développé sous forme d'appât contre les cafards et les fourmis, de spray ou de spot-on contre les puces, les tiques et les poux broyeurs des animaux de compagnie, dans les produits pour gazon contre les courtilières, en tant que produit phytosanitaire contre la chrysomèle des racines du maïs, les coléoptères de la pomme de terre ou les charançons du riz et du maïs ou contre les sauterelles, les termites et les insectes résistants aux pyréthroïdes, aux organophosphorés et aux carbamates (Connelly, 2001).

En ce qui concerne l'usage en tant qu'**antiparasitaire externe chez les animaux de compagnie**, le fipronil, distribué dans 120 pays, est l'antiparasitaire le plus vendu dans le monde. En France en 2004 il représentait 80% des antiparasitaires externes mis sur le marché et la quantité de fipronil distribuée était alors de 2310 kg (AFSSA, 2005). En ce qui concerne l'usage en tant que **produit phytosanitaire**, le fipronil a été interdit en France en février 2004 car le Régent®, insecticide commercialisé par la société BASF pour le traitement des semences de maïs dont la substance active est le fipronil, était accusé d'être responsable de la mortalité des abeilles. En Europe, une évaluation communautaire a suivi et s'est conclue par un rapport de l'European Food Safety Authority (EFSA, 2006) qui a conduit à une inscription du Régent TS par la directive 2007/57/CE du 16 août 2007, en tant qu'insecticide destiné au traitement des semences, à l'annexe I de la directive 91/414/CEE des substances actives autorisées dans la composition des produits phytopharmaceutiques. Cependant, il a été rappelé aux Etats membres qu'il convenait de rester particulièrement vigilant en ce qui concerne le risque potentiel du fipronil pour les abeilles.

2. Mode d'action

Le fipronil appartient à la seconde génération des insecticides agissant sur les canaux chlorure des récepteurs GABA (acide γ -aminobutyrique, Hainzl *et al.*, 1998). Le GABA est un des neurotransmetteurs inhibiteurs majeurs du cerveau (Ikeda *et al.*, 2001). Une perturbation de ces récepteurs entraîne chez l'insecte une paralysie tonique puis la mort. Il existe deux types de récepteurs GABA, le récepteur GABA_A et le récepteur GABA_B. Les récepteurs GABA sont des récepteurs à canaux ioniques. Ils sont sensibles aux

barbituriques, aux benzodiazépines, à la picrotoxine (extrait des fruits de la coque du Levant), à la bicuculline (alcaloïde des plantes), aux anesthésiques généraux, aux alcools, au muscimol (alcaloïde des champignons) et à certains insecticides (Ikeda et al., 2001). La fixation du GABA sur son site de reconnaissance sur le récepteur provoque l'ouverture d'un canal à ions chlorure qui produit l'hyperpolarisation de la cellule cible.

Le mécanisme d'action potentiel du fipronil, et de ses deux métabolites principaux fipronil sulfone et fipronil désulfinyl, a été caractérisé *in vitro* chez les mammifères et les insectes par l'étude de la capacité des molécules à déplacer le [³HBOB], un ligand spécifique des récepteurs GABA, de son site de liaison (Hainzl and Casida, 1996; Hainzl et al., 1998) ou par la méthode du patch-clamp (Ikeda et al., 2001; Zhao, et al., 2005; Li and Akk, 2008), et *in vivo* chez la souris ou la mouche (Hainzl and Casida, 1996; Hainzl et al., 1998). Ces études ont montré que le fipronil avait une action sur le récepteur GABA_A (Varro et al., 2009). L'insecticide exerce une inhibition non compétitive du récepteur. Pour cela, il n'est pas nécessaire que les canaux ioniques soient ouverts, c'est-à-dire que le GABA active le récepteur, même si cela facilite l'inhibition par le fipronil. Cette inhibition est lente et réversible (Ikeda et al., 2001). Les métabolites, et en particulier le fipronil sulfone, pourraient également inhiber les récepteurs GABA. Cependant, la toxicité relative du fipronil et de ses métabolites reste controversée, de même que la sélectivité du fipronil pour les récepteurs GABA des insectes plutôt que pour ceux des mammifères. En effet, la biotransformation du fipronil en fipronil sulfone serait pour certains un processus de détoxification de la molécule parente (Li et Akk, 2008) alors que d'autres études suggèrent que l'affinité du fipronil sulfone pour le récepteur GABA_A des mammifères est 7 fois plus grande que celle du fipronil (Hainzl et al., 1998; Zhao et al., 2005). De plus, *in vivo*, l'exposition du système nerveux central de la souris quasi exclusivement au fipronil, par inhibition totale de la biotransformation du fipronil en fipronil sulfone, ou quasi exclusivement au fipronil sulfone, par un traitement au fipronil rapidement métabolisé en fipronil sulfone, entraîne les mêmes signes d'empoisonnement et le même taux de mortalité (Hainzl et al., 1998), ce qui suggère que le fipronil et le fipronil sulfone sont aussi toxiques l'un que l'autre pour la souris. Les mêmes auteurs soulignent tout de même que le composé parent serait plus toxique pour les récepteurs GABA des insectes que pour ceux des mammifères.

Enfin, le fipronil comme le fipronil sulfone serait aussi un inhibiteur des récepteurs au glutamate, d'autres récepteurs à canaux ioniques avec un canal à ions chlorure. Or, ces récepteurs ne sont présents que chez les invertébrés, ce qui expliquerait la forte spécificité d'action du fipronil ou de son métabolite sur le système nerveux central des invertébrés (Zhao et al., 2005; Narahashi, 2010).

3. Métabolisme

Les métabolites du fipronil formés *in vivo* et identifiés par LC-MS/MS sont présentés dans la figure 11.

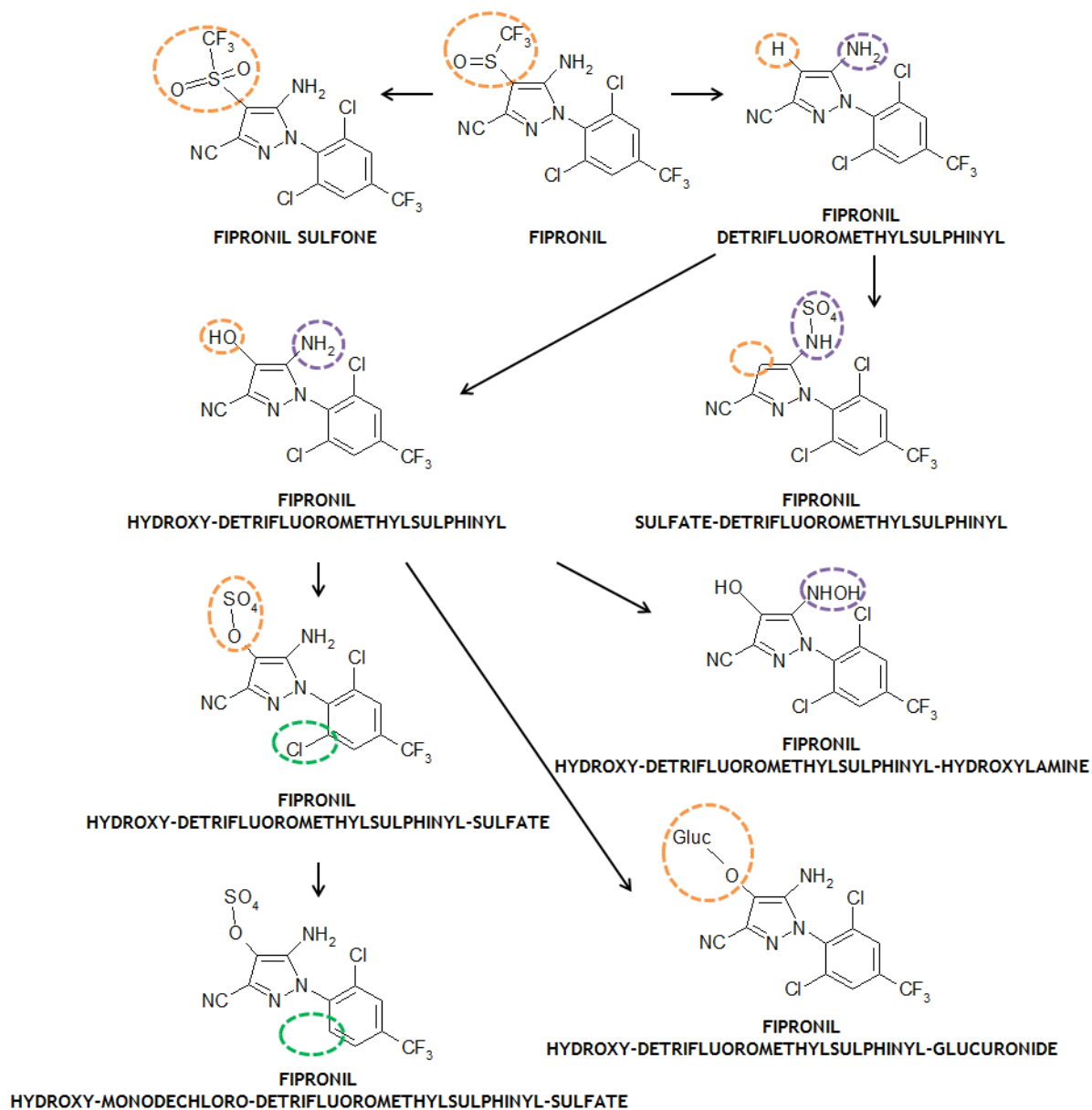


Figure 11: Métabolisme du fipronil
D'après Cravedi *et al.* (Under Review)

Le **fipronil sulfone**, obtenu par sulfoxydation du groupement thioéther du fipronil, est le **principal métabolite formé chez l'Homme et chez le rat**. En effet, chez le rat ayant reçu un bolus po de ^{14}C -fipronil (10 mg/kg), 90% de la radioactivité, retrouvée essentiellement dans le tissu adipeux, les surrénales, l'intestin, le foie et dans une moindre mesure dans le cerveau, était sous forme de fipronil sulfone (Cravedi *et al.*, Under Review). C'est aussi le principal métabolite formé *in vitro* par des microsomes humains ou

de rat (Tang *et al.*, 2004). La biotransformation du fipronil en fipronil sulfone **est localisée dans le foie sous l'action des cytochromes P450 (CYP)** et en particulier de l'isoforme 3A4 chez l'Homme (Tang *et al.*, 2004; Das *et al.*, 2006). La constante d'affinité du CYP3A4 pour le fipronil serait similaire chez l'Homme et chez le rat, alors que la vitesse maximale d'élimination du fipronil est supérieure chez le rat. Ceci indique qu'il y aurait des **différences interspécifiques en ce qui concerne la clairance du fipronil** chez ces deux espèces et que le fipronil sulfone pourrait être plus rapidement formé chez le rat que chez l'Homme (Tang *et al.*, 2004). De plus, le **fipronil sulfone est plus cytotoxique pour des hépatocytes humains et un plus fort inducteur des enzymes hépatiques** que le fipronil lui-même (Das *et al.*, 2006). Ces différences interspécifiques de biotransformation du fipronil en fipronil sulfone, pourrait conduire à des **différences interspécifiques dans le potentiel toxique du fipronil**. Ces différences interspécifiques ne sont cependant peu ou pas prises en compte dans les évaluations toxicologiques réglementaires.

4. Les données des évaluations toxicologiques réglementaires

Compte-tenu de la diversité des formulations du fipronil et de la diversité des usages de cet insecticide, l'Homme peut être exposé au fipronil par voie respiratoire, cutanée et orale. Pour la **contamination par voie respiratoire**, l'exposition humaine au fipronil résulte principalement de la présence de poussières ou de fines gouttelettes véhiculant la substance active dans l'air, notamment lors du traitement d'animaux domestiques avec un spray. Les personnes les plus exposées sont les professionnels affectés à la production du fipronil, à l'enrobage des semences ou à la formulation des produits, les agriculteurs utilisateurs de semences enrobées et les particuliers utilisant des produits conditionnés sous forme de sprays. Pour ce qui est de la production des médicaments vétérinaires par exemple, une étude a montré la présence de fipronil et de fipronil sulfone dans le plasma des travailleurs affectés à la fabrication des produits contenant du fipronil (Herin *et al.*, 2011). Pour la **contamination par voie cutanée**, les professionnels sont exposés lors de l'enrobage des semences ou la préparation des solutions concentrées de biocides à base de fipronil. L'exposition des particuliers est essentiellement accidentelle et résulte notamment du contact avec des animaux traités avec les antiparasitaires à base de fipronil. Pour la **contamination par voie orale**, la population générale peut être exposée par voie alimentaire via la consommation de denrées ou d'eau contenant des résidus de fipronil ou via un contact "main-bouche" lors de l'application des produits à base de fipronil (AFSSA, 2005). Du fipronil et/ou ses métabolites ont par exemple été retrouvés dans les graines de tournesol lors d'un traitement des racines de la plante (Aajoud *et al.*, 2006), dans le lait de vache quand les animaux ont été nourris avec

de l'ensilage de maïs traité au fipronil (Le Faouder *et al.*, 2007) ou dans le miel de fleurs (Jiménez *et al.*, 2008). Il existe donc une grande diversité des sources d'exposition au fipronil pouvant conduire à une contamination potentiellement importante de l'environnement humain.

a. Toxicité aiguë

Le fipronil est **peu à modérément toxique par voie cutanée** avec une DL₅₀ (Dose Létale 50 = dose conduisant à la mort de la moitié des individus) supérieure à 2 g/kg chez le rat et de 354 mg/kg chez le lapin. Ces doses sont supérieures aux doses administrées lors du traitement antiparasitaire des chats ou des chiens avec du fipronil (7.5 à 15 mg/kg avec du Frontline® en spray et 12.5 mg/kg avec du Frontline® Spot-on pour chats par exemple). La NOAEL (No Observable Adverse Effect Level = dose sans effet nocif observé) du fipronil par voie cutanée a été déterminée à 5 mg/kg/j à partir d'une étude sur des lapins traités 6h par jour pendant 21 jours à différentes doses de fipronil. Il est également **peu à modérément toxique par inhalation** avec une CL₅₀ (Concentration Létale 50) de 0.390 à 0.682 mg/L d'air chez le rat. Le fipronil est considéré comme **modérément toxique par voie orale** avec une DL₅₀ de 97 mg/kg chez le rat et de 95 mg/kg chez la souris. Le **fipronil sulfone a une toxicité aiguë par voie orale inférieure à celle du fipronil** chez le rat avec une DL₅₀ de 218 mg/kg. La NOAEL du fipronil par voie orale a été déterminée à 2.5 mg/kg à partir d'une étude sur des rats traités par gavage à différentes doses de fipronil. Les principaux signes observés lors de ces essais et quelque soit la voie d'administration étaient des signes neurologiques (tremblements, convulsions, piloérection, léthargie...) (AFSSA, 2005). Chez l'Homme, une ingestion accidentelle de fipronil à une dose d'environ 30 à 70 mg/kg (ingestion de 50 à 100 mL de Regent à 50 g/L de fipronil) est caractérisée par l'apparition de vomissements et de convulsions (Mohamed *et al.*, 2004).

b. Effet perturbateur thyroïdien du fipronil et différences interspécifiques

Des essais de **toxicité à moyen terme** à doses répétées par voie orale ont été réalisés chez le rat, le chien et la souris pendant une durée de 21, 28 ou 90 jours avec le fipronil ou certains de ces métabolites (AFSSA, 2005). Les doses non létales entraînent entre autres une diminution de la consommation d'aliment, une diminution du poids corporel, une hépatomégalie et une dégénérescence des hépatocytes chez les trois espèces. Des **effets sur la thyroïde** sont observés uniquement chez le rat avec une augmentation de la masse de la thyroïde, et une hypertrophie et/ou une hyperplasie des cellules folliculaires thyroïdiennes. Des **effets neurotoxiques** sont seulement observés

chez le **chien** après administration par voie orale de la dose élevée de 10 mg/kg/j de fipronil pendant 90 jours.

Lors des essais de **toxicité à long terme** (administration répétée de fipronil pendant au moins un an), on observe **chez le rat comme chez le chien des troubles neurologiques et des modifications morphologiques et fonctionnelles du foie, de la thyroïde et des reins**. Chez le rat, en plus des effets sur la thyroïde observés lors des études de toxicité à moyen et à long terme, les études de cancérogenèse ont montré une **augmentation de l'incidence des tumeurs folliculaires de la thyroïde** lors d'une administration quotidienne par voie orale et pendant la vie entière de 12.7 mg/kg/j de fipronil chez les mâles et de 16.7 mg/kg/j de fipronil chez les femelles. Le fipronil ne posséderait pas d'activité mutagène qui pourrait expliquer ces tumeurs thyroïdiennes mais il induirait un déséquilibre hormonal à l'origine de l'apparition des tumeurs caractérisé par une **diminution des concentrations plasmatiques de T₄** et une **augmentation des concentrations de TSH**. En revanche, le niveau de T₃ circulant ne serait pas modifié. Les effets sur la concentration de T₄ et de TSH seraient réversibles dès la deuxième semaine suivant l'arrêt du traitement. Cette étude met également en évidence une atteinte hépatique par une augmentation du poids du foie et des perturbations biochimiques et une augmentation de la clairance biliaire de la T₄ (AFSSA, 2005). Cet effet perturbateur thyroïdien du fipronil concorde avec les résultats obtenus par Leghait *et al.* (2009) qui montrent une augmentation de l'élimination des hormones thyroïdiennes associée à une augmentation de l'activité hépatique des UGT impliquées dans le métabolisme des hormones thyroïdiennes. De plus, **le fipronil augmenterait la capture d'iode dans la thyroïde ainsi que l'activité de la TPO** (Hurley, 1998).

Cependant, **les données expérimentales disponibles sur la cancérogenèse thyroïdienne due au fipronil ne conduisent pas à suspecter un risque cancérogène pour l'Homme**. En effet, chez le rat, les tumeurs folliculaires thyroïdiennes observées résultent d'une diminution des hormones thyroïdiennes qui conduisent à une forte augmentation de la sécrétion de TSH provoquant ensuite un emballement de la dynamique cellulaire au niveau de la thyroïde. Chez l'Homme, la présence de TBG plasmatique pourrait réduire la sensibilité à la perturbation thyroïdienne en limitant la diminution des hormones thyroïdiennes circulantes, le rétrocontrôle négatif induisant une augmentation de la production de TSH et ainsi les tumeurs de la thyroïde. L'effet perturbateur thyroïdien du fipronil chez le rat pourrait donc être expliqué par des mécanismes biologiques propres à cette espèce (AFSSA, 2005) et notamment à une différence entre le rat et l'Homme en termes de protéines plasmatiques de transport des hormones thyroïdiennes et de temps de demi-vie des hormones thyroïdiennes. Une étude menée chez le mouton, espèce plus

proche de l'Homme en termes de transport plasmatique des hormones thyroïdiennes, montrant un effet perturbateur thyroïdien très limité du fipronil (Leghait *et al.*, 2010) souligne d'autant plus la présence d'un facteur espèce et la **nécessité de se poser la question de la validité des modèles animaux utilisés pour étudier une perturbation thyroïdienne chez l'Homme.**

c. Un effet perturbateur thyroïdien du fipronil qui peut être lié à la métabolisation du fipronil en fipronil sulfone

Une des causes possibles des différences de réponse entre espèces réside dans une **différence en termes de métabolisme du fipronil**. En effet, le fipronil est décrit comme un perturbateur thyroïdien chez le rat engendrant une augmentation de la clairance de la T₄. Cet effet perturbateur thyroïdien du fipronil est associé à une exposition quasi exclusive des rats au principal métabolite du fipronil formé *in vivo*, le fipronil sulfone, plutôt qu'au fipronil lui-même (Leghait *et al.*, 2009). Chez le mouton, l'effet perturbateur thyroïdien d'un traitement au fipronil est beaucoup plus limité. Or, le mouton est moins exposé au fipronil sulfone que le rat (Leghait *et al.*, 2010). **Le fipronil sulfone pourrait être responsable de la perturbation thyroïdienne plutôt que le fipronil lui-même.** Cependant, l'éventualité d'un effet perturbateur thyroïdien du fipronil sulfone n'a pas été prise en compte lors des évaluations toxicologiques réglementaires. Ceci est d'autant plus critique que le fipronil sulfone persiste plus longtemps dans l'organisme que le fipronil lui-même. Ainsi, chez le rat, la demi-vie du fipronil est de seulement 8.5h contre 208h pour le fipronil sulfone (Mohamed *et al.*, 2004). Chez le mouton, après un traitement au fipronil, les concentrations plasmatiques en fipronil sulfone semblent diminuer plus lentement que celles en fipronil et reste détectable plus longtemps (Leghait *et al.*, 2010). Chez l'Homme, le fipronil est rapidement transformé en fipronil sulfone et n'est plus détectable dans le plasma au bout de 15 à 20h après une ingestion accidentelle de fipronil (Mohamed *et al.*, 2004). La fonction thyroïdienne est majoritairement impliquée dans des processus de développement sur le long terme. Par conséquent, une interférence avec la fonction thyroïdienne sera d'autant plus délétère qu'elle durera longtemps. **Le potentiel perturbateur thyroïdien du fipronil pourrait donc dépendre de la capacité de chaque espèce à métaboliser le fipronil en fipronil sulfone en supposant que la biotransformation du fipronil en fipronil sulfone soit une voie de bioactivation de l'insecticide.**

G. Objectifs et projet de thèse

Le fipronil est un perturbateur thyroïdien chez le rat. Cependant, le rat est un modèle animal controversé pour l'étude des perturbateurs thyroïdiens potentiels chez l'Homme du fait de différences interspécifiques en termes de transport plasmatique des hormones thyroïdiennes. De plus, les résultats des études de toxicologie comparative d'espèce ont montré que la différence de perturbation thyroïdienne dans les différents modèles animaux, le rat et le mouton, était associée à une différence d'exposition interne au principal métabolite du fipronil formé *in vivo*, le fipronil sulfone. Cela suggère un rôle potentiel du métabolite dans la perturbation thyroïdienne engendrée par un traitement au fipronil.

L'objectif de ce travail de thèse était de mieux caractériser le **mode d'action du fipronil sur la fonction thyroïdienne au niveau hépatique** en s'intéressant notamment 1) au **rôle potentiel du principal métabolite du fipronil formé *in vivo*, le fipronil sulfone**, et 2) aux **différences interspécifiques de métabolisme du fipronil et/ou de sensibilité à la perturbation thyroïdienne** qui peuvent préjuger de la **pertinence des différents modèles animaux en termes d'analyse du risque du fipronil pour la santé humaine**.

Pour y répondre, nous avons choisi :

- de déterminer quel était le **rôle du fipronil sulfone dans la perturbation thyroïdienne** engendrée par un traitement au fipronil, de préciser les **voies métaboliques mises en jeu au niveau hépatique** impliquées dans cette perturbation et si ces voies étaient sensibles à l'action du métabolite (chapitres 2 et 3)
- de nous appuyer sur un modèle de **toxicologie comparative d'espèce *in vitro*** afin de quantifier le **potentiel effet perturbateur thyroïdien du fipronil chez l'Homme** comparativement à nos deux espèces modèles (chapitre 4)
- de préciser les **mécanismes moléculaires impliqués dans la perturbation thyroïdienne** engendrée par un traitement au fipronil et notamment le rôle des récepteurs nucléaires xénosenseurs (chapitre 5)

ETUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE 1: MODELES D'ETUDE ET METHODES D'ANALYSE GENERAUX

A.Traitement au fipronil et au fipronil sulfone

1. Fipronil

Le fipronil (lot B20050318, pureté estimée par le fournisseur à 95.6%) a été acheté chez 3B Medical Systems Inc. (Libertyville, IL, USA).

2. Fipronil sulfone

Le fipronil sulfone administré par voie orale à des rats pour déterminer les paramètres pharmacocinétiques de la molécule (chapitre 2) et utilisé pour étudier les différences interspécifiques en termes de perturbation thyroïdienne sur hépatocytes de rat, de mouton et d'Homme (chapitre 4) provenait de Crescent Chemical (Islandia, NY, USA; lot 429-35B, pureté estimée par le fournisseur à 99.3%). Pour toutes les autres expérimentations, le fipronil sulfone a été synthétisé à partir du fipronil. Brièvement, de l'acide 3-chloroperbenzoïque (2.024 g, 11.7 mmol, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) a été ajouté au fipronil (1.684 g, 3.86 mmol) dans du dichlorométhane (40 mL). La suspension obtenue a été conservée à température ambiante pendant 3 jours. La phase organique a ensuite été successivement rincée par de l'hydroxyde de sodium 0.2M (20 mL, deux fois), de l'eau (20 mL), et une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium (20 mL). Après séchage avec du sulfate de magnésium, le solvant a été évaporé et du dichlorométhane a été ajouté à l'extrait sec. Le fipronil sulfone a ensuite été précipité (1.245 g ont été obtenus, soit un rendement de 74%). Le point de fusion de la poudre obtenue était de 218-219°C, ce qui correspond au point de fusion connu du fipronil sulfone (219-221.5°C, Buntain *et al.*, 1988) alors que celui du fipronil est de 195.5-203°C (Connelly, 2001). L'absence de fipronil a ensuite été vérifiée par spectrométrie de masse.

3. Piperonyl butoxide

Le piperonyl butoxide, sous forme liquide, administré par voie orale à des rats (chapitre 2) ou utilisé pour étudier l'effet d'une inhibition de la biotransformation du fipronil en fipronil sulfone sur hépatocytes (chapitre 4) provenait de Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France: pureté estimé par le fournisseur à 90%).

4. Préparation des solutions de traitement

Toutes les solutions ont été protégées de la lumière pendant toute la durée des expérimentations. Les différents solvants utilisés pour administrer le fipronil, le fipronil sulfone et/ou le piperonyl butoxide sont présentés dans le tableau 13.

Chapitre	Expérimentation	Solvant	Concentration solution
2	Administrations répétées de fipronil chez le rat	Solution aqueuse de méthylcellulose (0.5% w/v) + Tween 80 (0.01%, w/v)	Fipronil 1.5 mg/mL en suspension
5	Transcriptome hépatique du rat		
2	Administration unique de fipronil ou de fipronil sulfone chez le rat po	Dissolution dans de l'éthanol (0.14 mg/μL) + mélange à de l'huile de maïs	Fipronil 1.5 mg/mL et fipronil sulfone 1.55 mg/mL en solution (concentrations équimolaires de 3.4 μmoles/mL)
3	Toxicologie comparative du fipronil et du fipronil sulfone chez le rat		
2	Inhibition de la biotransformation du fipronil en fipronil sulfone chez le rat	Dissolution du fipronil dans de l'éthanol (0.14 mg/μL) + mélange à de l'huile de maïs contenant le piperonyl butoxide	Fipronil 3 mg/mL + piperonyl butoxide 625 mg/mL en solution Fipronil 1.5 mg/mL + piperonyl butoxide 208 mg/mL, 625 mg/mL puis 1000 mg/mL en solution
5	Expérimentations sur les souris	Solution d'eau gommeuse (gomme arabique 3%, w/v)	Fipronil 1 mg/mL (transcriptome hépatique de souris), 2 mg/mL (cinétique de ¹³ C ₆ -LT ₄) ou 3.5 mg/mL en suspension
2	Administration unique de fipronil ou de fipronil sulfone chez le rat iv	Solution de DMSO/Ethanol/eau (v/v/v)	Fipronil 1.5 mg/mL et fipronil sulfone 1.55 mg/mL en solution (concentrations équimolaires de 3.4 μmoles/mL)
4	Traitement des hépatocytes de rat, de mouton et d'Homme	DMSO	Dilutions sériées de fipronil et de fipronil sulfone en solution et dilution du piperonyl butoxide

Tableau 13: Modalités d'administration du fipronil, du fipronil sulfone et du piperonyl butoxide dans les différentes expérimentations.

5. Modalités d'administration des traitements

In vivo, les doses de fipronil (1.5 à 10 mg/kg) étaient de l'ordre de celles décrites comme induisant une perturbation thyroïdienne chez le rat (AFSSA, 2005; Leghait *et al.*, 2009). Le fipronil sulfone a été administré à des doses molaires identiques à celles en fipronil. Le détail de la démarche expérimentale ayant permis d'établir que des traitements au fipronil et au fipronil sulfone à des doses équimolaires devaient permettre

d'obtenir des concentrations plasmatiques en fipronil sulfone identiques à l'état d'équilibre est présenté dans le chapitre 2. La justification des différentes doses de piperonyl butoxide utilisées est présentée également dans le chapitre 2. Le choix d'une administration des traitements par gavage oro-gastrique permettait de mieux contrôler les doses administrées à chaque animal que lors d'une prise spontanée d'aliment tout au long de la journée par des animaux placés en hébergement collectif.

In vitro, les concentrations en fipronil et en fipronil sulfone toxiques pour les hépatocytes humains en culture ont été déterminées après 24h de culture avec du fipronil ou du fipronil sulfone. La dégradation de 50% des fonctions biologiques ou biochimiques des hépatocytes survenait pour une concentration en fipronil de 30 μM et une concentration en fipronil sulfone de 15 μM (PNRPE "Fipronil et retardateurs de flamme polybromés: exposition et altération des fonctions thyroïdienne et corticosurrénalienne", données non publiées). Les hépatocytes ont donc été traités avec des concentrations inférieures aux concentrations cytotoxiques conduisant à des concentrations plasmatiques en fipronil sulfone de l'ordre de celles retrouvées chez le rat ou le mouton *in vivo* ou chez l'Homme. Lors de l'étude des différences interspécifiques en termes de perturbation thyroïdienne sur hépatocytes de rat, de mouton et d'Homme un traitement des hépatocytes avec du fipronil à 40 μM a également été ajoutée pour servir de témoin positif de cytotoxicité. La dose de piperonyl butoxide a été fixée à une dose inférieure à celle précédemment utilisée sur hépatocytes de rat par Niknahad and O'Brien (2004) pour prévenir tout effet cytotoxique potentiel de la molécule.

B. Modèles animaux

1. Origine et hébergement des animaux

Les rats étaient des rats Wistar femelles adultes, de 200 à 250g, provenant de chez Janvier (Wistar RjHan:WI, Le Genest Saint Isle, France), Harlan (Wistar HsdHan:WIST Outbred, Gannat, France) ou Charles River (Wistar Crl:WI, L'Abresle, France). Les rates étaient hébergées par 2 à 4 en cage, excepté lors de la pose d'un cathéter où elles étaient hébergées en cages individuelles. Elles étaient placées dans des armoires à rongeurs afin d'être soumises à un cycle lumineux inversé (lumières éteintes de 9:00 à 21:00, manipulation des animaux pendant leur phase d'activité) dans l'animalerie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT, France) ou, pour l'étude du transcriptome hépatique de rat (chapitre 5), sur des portoirs et soumises à un cycle lumineux non inversé (lumières allumées de 7:00 à 19:00) dans l'animalerie de l'Institut National de la Recherche Agronomique de St Martin de Touch (INRA, France). Les rates ont été acclimatées aux conditions du laboratoire pendant au moins une semaine avant le début des expérimentations. La nourriture (2016 Teklad Diet, Harlan, Gannat, France; ou A04, SAFE, Augy, France) et l'eau ont été fournies *ad libitum*. Les rates ont été pesées deux fois par semaine et, pour chaque solution administrée, les volumes ont été ajustés au dernier poids relevé.

Les souris étaient des souris mâles C57BL/6J adultes. Les souris sauvages (wild-type) provenait de chez Janvier (C57BL/6J Rj, Le Genest St Isle, France). Les souris transgéniques déficientes pour le récepteur nucléaire CAR (CAR^{-/-}) ou pour le récepteur nucléaire PXR (PXR^{-/-}) avec un fond génétique C57BL/6J ont été obtenues respectivement grâce à un don du Professeur David D. Moore (Department of Molecular and Cellular Biology, Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA) et du Professeur Steven A. Kliewer (Department of Pharmacology, University of Texas Southwestern Medical Centre, Dallas, TX, USA). Les animaux à l'origine des colonies ont été fournis par le Professeur Urs A. Meyer (Division of Pharmacology/Neurobiology, Biozentrum of the University of Basel, Bâle, Suisse). Les souris étaient hébergées par 4 à 10 en cage. Elles étaient placées sur des portoirs et soumises à un cycle lumineux non inversé (lumières allumées de 7:00 à 19:00) dans l'animalerie de l'Institut National de la Recherche Agronomique de St Martin de Touch (INRA, France). Les souris ont été acclimatées aux conditions du laboratoire pendant au moins deux semaines avant le début des expérimentations. La nourriture (A04, SAFE, Augy, France) et l'eau ont été fournies *ad libitum*. Les souris ont été pesées une fois par semaine et, pour chaque solution administrée, les volumes ont été ajustés au dernier poids relevé.

2. Modèle de rat pseudo-euthyroïdien

Un modèle de rat pseudo-euthyroïdien a été développé et validé dans le laboratoire par Leghait *et al.* (2009). Brièvement, la production de T_4 endogène a été supprimée dans ce modèle par une ablation chirurgicale de la thyroïde afin d'être en mesure de contrôler parfaitement le taux d'entrée de la T_4 dans l'organisme. Contrairement aux méthodes utilisant de la thyroxine marquée (Soldin *et al.*, 2010), ce modèle est le seul qui permet de déterminer conjointement *in vivo* les clairances de la T_4 totale et de la T_4 libre. Or, de précédentes études ont montré que la clairance de la T_4 libre pourrait être un biomarqueur plus précoce et plus sensible d'une perturbation résultant d'une modification du métabolisme des hormones thyroïdiennes (Leghait *et al.*, 2009; Leghait *et al.*, 2010). A la suite de la thyroïdectomie, les animaux ont été supplémentés en T_3 , la forme bioactive des hormones thyroïdiennes, pour conserver un état pseudo-euthyroïdien compatible avec le maintien d'une activité des enzymes hépatiques normale, ces enzymes étant dépendantes de l'apport en hormones thyroïdiennes au niveau du foie (Liddle *et al.*, 1998; Masmoudi *et al.*, 1997).

Les rates ayant reçu du fipronil avec trois doses successives de piperonyl butoxide (chapitre 2) ou ayant reçu un bolus intrapéritonéal (ip) de T_4 ou d'antipyrine (chapitre 3) ont été thyroïdectomisées (THX) une semaine avant le début du traitement au fipronil sous anesthésie générale (kétamine/médétomidine ip: Chlorkétam 1000®, Vétoquinol, Lure, France: 37.5 mg/kg de kétamine / Domitor®, Pfizer, France: 0.5 mg/kg de médétomidine; ou anesthésie gazeuse: AErrane®, Baxter SA, Maurepas, France, 2 à 2.5% d'isoflurane dans de l' O_2). Elles ont été traitées en préopératoire avec un anti-infectieux à base de sulfadoxine/trimethoprim en sous-cutanée (sc) (Borgal®, Intervet SA, Angers, France: 6.25 mg/kg de sulfadoxine et 1.25 mg/kg de trimethoprim) et un anti-inflammatoire à base de flunixin méglumine sc (Finadyne®, Schering-Plough, Courbevoie, France: 5 mg/kg; ou Meflosyl®, Fort Dodge Santé Animale, Tours, France: 5 mg/kg). Juste après la chirurgie, les rates ont également reçu 0.5 mL sc de Téracalcium® (Vétoquinol, Lure, France) ou 5 mL sc de Lactate de Ringer (B Braun Medical, Boulogne, France) afin de prévenir une hypocalcémie due à une excision ou à une dévascularisation des parathyroïdes lors de la chirurgie. Le traitement antibiotique et l'administration de Téracalcium ou de Lactate de Ringer ont été renouvelés le lendemain de la thyroïdectomie. Dès le lendemain des thyroïdectomies et jusqu'à la fin des expérimentations, les rates ont été supplémentées quotidiennement par de la T_3 (10 μ g/kg/j, sc) à une dose calculée pour restaurer à l'état d'équilibre des concentrations plasmatiques en T_3 proche des concentrations physiologiques (Leghait *et al.*, 2009) et ainsi assurer le maintien d'un état pseudo-euthyroïdien.

3. Prélèvements sanguins sériés

Des prélèvements sanguins sériés ont été réalisés chez les rates ayant reçu des administrations répétées de fipronil ou une administration unique de fipronil ou de fipronil sulfone (chapitre 2) et chez les rates ayant reçu un bolus ip de T₄ ou d'antipyrine (chapitre 3). Un cathéter a été placé dans une des veines fémorales deux jours au moins avant le début d'une cinétique sous une anesthésie kétamine/médétomidine ou gazeuse. Tous les prélèvements de sang ont été collectés dans des tubes héparinés (10 µL d'héparine diluée au 1/10^e dans des tubes Eppendorf®, Heparine Choay®, 50 UI/mL, Sanofi-aventis, France). Après chaque prélèvement de sang (150 µL à 200 µL afin de ne pas dépasser 10% du volume sanguin total prélevé à la fin de la cinétique), un volume de sérum physiologique stérile (B Braun Medical, Boulogne, France) équivalent au volume de sang collecté a été administré, suivi de 150 µL de sérum physiologique hépariné correspondant au volume mort du cathéter (héparine au 1/100^e).

4. Prélèvements terminaux

Le sang total a été collecté chez les rats après une anesthésie au CO₂ ou à l'isoflurane par ponction de l'aorte abdominale, de la veine cave postérieure ou via le cathéter. Il a été collecté chez les souris après une anesthésie à l'isoflurane par ponction intracardiaque. Tous les prélèvements de sang ont été collectés dans des tubes héparinés, centrifugés à 4000 x g pendant 15 minutes à +4°C et le plasma a été stocké à -20°C jusqu'aux dosages.

Lors de l'étude de la toxicologie comparative du fipronil et du fipronil sulfone *in vivo* (chapitre 3), les foies ont été perfusés via le cathéter ou via la veine cave postérieure avec du sérum physiologique stérile (15 mL/min, 20 mL par foie), puis ils ont été rapidement congelés dans de l'azote liquide et stockés à -80°C jusqu'à la préparation de fractions subcellulaires. Lors de l'étude des mécanismes moléculaires de la perturbation thyroïdienne engendrée par un traitement au fipronil (chapitre 5), un bout du grand lobe de chaque foie a été partagé en cinq morceaux qui ont été rapidement congelés dans de l'azote liquide et stockés à -80°C jusqu'à l'extraction des ARNm.

C.Modèles cellulaires

1. Origine et obtention des hépatocytes

Les hépatocytes de rat et d'Homme étaient des hépatocytes collectés à partir d'un foie entier ou de fragments de foie perfusés et cryopréservés au sein de l'équipe "Toxicologie cellulaire et moléculaire des xénobiotiques" de l'UMR1331 Toxalim basée à l'INRA de Sophia-Antipolis. Les hépatocytes humains ont été obtenus lors de résections de tumeurs secondaires hépatiques. Les hépatocytes de mouton étaient des hépatocytes frais isolés au sein de l'équipe "Pesticides Perturbateurs Endocriniens" de l'UMR1331 Toxalim basée à l'ENVT. Tous les hépatocytes ont été isolés par perfusion à la collagénase selon le protocole de Berry and Friend (1969).

2. Réactifs

Le milieu L15, le milieu Williams' E, l'insuline (Insulin-Tranferrin-Selenium-A), la solution de pénicilline/streptomycine et le sérum de veau fœtal provenaient de chez Life Technologies (Saint-Aubin, France), le Percoll de chez GE Healthcare (Buc, France), l'hydrocortisone hémisuccinate, la BSA (Bovine Serum Albumine), l'érythrosine B et le collagène de chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France), la collagénase de chez Boehringer Mannheim (Mannheim Corp., Sydney, Australie) et le test de dosage du MTT de chez Clinisciences (Nanterre, France).

3. Modalités de mise en culture des hépatocytes

Les hépatocytes isolés ont été mis en suspension dans du milieu L15 + Percoll 70% contenant 10% de sérum de veau fœtal, 50 UI/mL de pénicilline, 50 µg/mL de streptomycine et 0.1 UI/mL d'insuline. La viabilité des hépatocytes a été déterminée par le test d'exclusion à l'érythrosine B et était de 75 à 80% au moins en fonction de l'espèce. Les hépatocytes ont ensuite été mis en culture dans des plaques 96-puits coatées au collagène de type I et mis à incuber à 37°C sous une atmosphère humide chargée à 5% de CO₂.

Une heure et deux heures après la mise en culture, le milieu a été remplacé par du milieu Williams' E contenant 10% de sérum de veau fœtal, 50 UI/mL de pénicilline, 50 µg/mL de streptomycine et 0.1 UI/mL d'insuline. Le lendemain, le milieu a été remplacé par du milieu Williams' E contenant 300 µg/mL de BSA, 1 µM d'hydrocortisone hémisuccinate, 50 UI/mL de pénicilline, 50 µg/mL de streptomycine et 0.1 UI/mL d'insuline et les différents traitements. Vingt-quatre heures après, le dernier milieu a été renouvelé et supplémenté en T₄ afin de déterminer la clairance de la T₄ en fonction des différents traitements.

D.Méthodes d'analyse

Les méthodes utilisées pour doser le fipronil et le fipronil sulfone ou les hormones thyroïdiennes ont toutes été validées selon les critères d'acceptabilité de la Food and Drug Administration (2001).

1. Dosage du fipronil et du fipronil sulfone

a. HPLC/MS/MS

Chez des rates ayant reçu des administrations répétées de fipronil (chapitre 2), les concentrations plasmatiques en fipronil et en fipronil sulfone ont été mesurées par le laboratoire Avogadro (Fontenilles, France) par LC/MS (Liquid Chromatography/Mass Spectrometry) en couplant une chaîne HPLC (High Performance Liquid Chromatography) à un triple quadrupole (Quattro Micro™ API, Waters Corporation, Saint Quentin en Yvelines, France). Cinquante µL de plasma ont été extraits par extraction liquide/liquide. Dix µL d'eau/acétonitrile purifiée (50/50, v/v) ont été ajoutés au plasma, vortexés 30 s et la préparation a été centrifugée 5 min à 16060 x g à 5°C. La phase supérieure a été récupérée dans sa totalité puis évaporée sous azote à 25°C. L'extrait sec a été reconstitué avec 150 µL de méthanol-acétate d'ammonium 5 mM (90/10, v/v) puis vortexé 30s. Les échantillons extraits ont ensuite été passés sur une colonne C18 (BDS Hypersil C18, 3 µm, 100 x 3 mm, Thermo Electron Corporation, Courtaboeuf, France). Les molécules extraites ont été ionisées en mode négatif et détectées respectivement selon les transitions MRM (Multiple Reaction Monitoring) m/z 435>330 et m/z 451>415 pour le fipronil et le fipronil sulfone, avec des énergies de collisions de 16 eV et de 17 eV. Le coefficient de variation moyen intra-jour pour trois contrôles qualité (8, 30 et 80 ng/mL) était de 3.2% pour le fipronil et de 6.9% pour le fipronil sulfone. La limite de quantification (LOQ) était de 5 ng/mL pour les deux molécules.

b. HPLC/UV/MS

Les concentrations en fipronil et en fipronil sulfone ont été déterminées par HPLC couplée à une détection UV (Ultraviolet)/MS selon la méthode développée au laboratoire par Lacroix *et al.* (2010) dans le plasma des rates ayant reçu du piperonyl butoxide (chapitre 2), un bolus ip de T₄ ou d'antipyrine (chapitre 3) ou utilisées pour étudier le transcriptome hépatique (chapitre 5), et dans le milieu extracellulaire des hépatocytes de rat utilisés pour déterminer les conditions de mise en culture pour étudier un effet perturbateur thyroïdien (chapitre 4). Cette méthode a été développée pour couvrir une plus large gamme de concentrations en fipronil et en fipronil sulfone que la méthode

précédente. Les coefficients de variation moyens intra- et inter-jours étaient inférieurs à 15% pour le fipronil (trois contrôles qualité) comme pour le fipronil sulfone (cinq contrôles qualité). La limite de quantification était de 2.5 ng/mL pour les deux molécules, excepté pour l'étude sur hépatocytes de rat où elle était de 50 ng/mL, concentration supérieure aux concentrations attendues.

c. UPLC/MS/MS

Dans le plasma des rates ayant reçu une administration unique de fipronil ou de fipronil sulfone (chapitre 2), celui des souris ayant reçu un bolus ip de $^{13}\text{C}_6\text{-LT}_4$ (chapitre 5) et le milieu extracellulaire des hépatocytes de rat utilisés pour étudier l'effet d'une inhibition de la biotransformation du fipronil, ou de rat, de mouton et d'Homme utilisés pour déterminer les différences interspécifiques en termes de perturbation thyroïdienne (chapitre 4), les concentrations en fipronil et en fipronil sulfone ont été déterminées par LC/MS en couplant une chaîne UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) à un triple quadrupole (Xevo mass spectrometer, Waters, Milford, MA, USA). Soixante-quinze μL de plasma, mixés avec 75 μL de standard interne (5-amino-3-cyano-1-(2,6-dichloro-4(trifluorométhyl-phenyl)-4-ethylsulfinylpyrazole ou Ethiprole, 1 $\mu\text{g/mL}$), ont été extraits par extraction en phase solide sur une cartouche SPE (Bond Elut C8 Varian® 100 mg, les Ulis, France) selon la méthode décrite par Lacroix *et al.* (2010). Cette méthode a été développée car elle permettait de couvrir la même gamme de concentrations en fipronil et en fipronil sulfone que la méthode précédente en ayant une détection linéaire en MS/MS tout en gagnant en temps de passage des échantillons. Les coefficients de variation moyens intra- et inter-jours étaient inférieurs à 15% pour le fipronil (cinq contrôles qualité) comme pour le fipronil sulfone (cinq contrôles qualité). La limite de quantification (LOQ) était de 2.5 ng/mL pour les deux molécules.

2. Dosage des hormones thyroïdiennes

a. T₄, T₃ et TSH par dosage radioimmunologique

Les concentrations en hormones thyroïdiennes ont été mesurées grâce à des kits Coat-a-count® de dosage radioimmunologique de chez Siemens Healthcare Diagnostics (Los Angeles, CA, USA) dans le plasma de rates ayant reçu un bolus ip de T₄ (TT4 (T₄ totale), FT4 (T₄ libre) et TT3 (T₃ totale), chapitre 3), dans le milieu extracellulaire des hépatocytes de rat utilisés pour déterminer les conditions de mise en culture pour étudier un effet perturbateur thyroïdien, ou de rat, de mouton et d'Homme utilisés pour déterminer les différences interspécifiques en termes de perturbation thyroïdienne (TT4, chapitre 4), dans le plasma de souris ayant reçu 10 mg/kg/j de fipronil (TT4 et TT3, chapitre 5), et

dans le plasma de rates utilisées pour l'étude du transcriptome hépatique (TT4, TT3, FT4 et FT3 (T_3 libre), chapitre 5). Les concentrations plasmatiques en TSH chez les rates utilisées pour l'étude du transcriptome hépatique (chapitre 5) ont été mesurées grâce à un kit de dosage radioimmunologique de chez GE Healthcare (Buc, France). Tous les dosages ont été réalisés selon les instructions des fournisseurs. Les coefficients moyens intra- et inter-jours pour trois contrôles qualité étaient inférieurs à 15% pour tous les dosages. Les limites de quantification étaient validées à 5 ng/mL pour la TT4 et 0.2 ng/mL pour la TT3. La limite de détection a été considérée comme étant la plus faible valeur de la gamme du dosage pour la FT4 (1 pg/mL), la FT3 (0.52 pg/mL) et la TSH (2.1 ng/mL).

b. Métabolites des hormones thyroïdiennes et $^{13}C_6$ -LT₄ par UPLC/MS/MS

Dans le plasma de rates ayant reçu un bolus ip de T_4 (chapitre 3), dans le plasma de souris ayant reçu un bolus ip de $^{13}C_6$ -LT₄ (chapitre 5) et dans le milieu extracellulaire des hépatocytes de rat utilisés pour étudier l'effet d'une inhibition de la biotransformation du fipronil (chapitre 4), les concentrations en T_4 , T_3 , T_2 (diiodothyronine), r T_3 (reverse triiodothyronine), MIT (monoiodotyrosine), DIT (diiodotyrosine), Tetrac (acide tetraiodothyroacétique), Triac (acide triiodothyroacétique) et $^{13}C_6$ -LT₄ (seulement chapitre 5) ont été déterminées par LC/MS en couplant une chaîne UPLC à un triple quadrupole (Xevo mass spectrometer, Waters, Milford, MA, USA). Le plasma, mixé avec de la T_4 deutérée (T_4 -d₅, chapitres 3 et 5) ou de la $^{13}C_{12}$ -LT₄ (chapitre 4) comme standard interne (1 µg/mL pour les deux standards), a été extrait en phase solide sur une cartouche SPE (Strata X-C, Phenomenex, LePecq, France). Les échantillons extraits ont été séparés sur une colonne C18 (Acquity BEH® RPC18, 2.1 x 100 mm, 1.7 µm, Waters) avec un gradient d'élution eau/acétonitrile acidifié avec 0.05% d'acide formique. Les échantillons ont été ionisés en mode positif et détectés selon les transitions MRM suivantes: T_4 m/z 778>605, T_3 et r T_3 m/z 652>606, T_2 m/z 526>480, $^{13}C_6$ -LT₄ m/z 783>737, T_4 -d₅ m/z 783>201 et $^{13}C_{12}$ -LT₄ m/z 790>744. Les coefficients moyens intra- et inter-jours pour trois contrôles qualité étaient toujours inférieurs à 15%. Les courbes de calibration couvraient des concentrations de 5 à 100 ng/mL pour la T_4 , de 0.2 à 100 ng/mL pour la T_2 , la $^{13}C_6$ -LT₄ et la T_3 , et de 1 à 100 ng/mL pour la r T_3 . La T_2 utilisée pour réaliser les gammes était de la 3,5-Diiodo-L-thyronine (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) mais la sélectivité de la méthode entre les trois isomères de T_2 (3,3'-diiodothyronine, 3',5'-diiodothyronine et 3,5-diiodothyronine) n'a pas été évaluée. Les pourcentages d'extraction étaient respectivement de 104%, 108%, 46% et 147% pour la T_4 , la T_3 , la r T_3 et la T_2 . Les résultats des dosages des MIT, DIT, Tetrac et Triac étaient difficilement interprétables.

3. Détermination des expressions des ARNm par RT-qPCR

a. Toxicologie comparative du fipronil et du fipronil sulfone *in vivo*

Les ARN hépatiques totaux ont été extraits avec du TRIzol® (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) selon les recommandations du fournisseur et 2 µg d'ARN ont été soumis à une transcription réverse (SuperScript™ II reverse transcriptase, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Les RT-qPCR ont été réalisées en utilisant du SYBR Green (SYBR Green TaqMan Universal PCR master mix, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). La fluorescence a été mesurée et analysée (7300 Real Time PCR detection system instrument, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) et les données ont été normalisées par l'expression de l'ARNm de la TATA-box binding protein (*Tbp*). Les résultats ont été exprimés

selon l'équation suivante:
$$\frac{2^{(Ct\ Tbp - Ct\ gene)_{sample}}}{\text{mean}[2^{(Ct\ Tbp - Ct\ gene)}]_{vehicle\ group}}$$
, où Ct correspond au

nombre de cycles permettant d'obtenir un signal fluorescent au-dessus d'un seuil prédéfini. Les amorces utilisées sont présentées dans le tableau 14 et leur efficacité a été testée.

Gène	NCBI Refseq	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>Tbp</i>	NM_001004198	ccacaccagcctctgagagc	agccaagattcacggtggat
<i>Ugt1a1</i>	NM_012683	cttcagaaaaagccctatccca	ccaaagagaaaaccacgatgc
<i>Sult1b1</i>	NM_022513	gaacaaaatgttctctggagcaag	tgatggagttttctcaagagttcaa
<i>Cyp1a1</i>	NM_012540	cagtccttctcacagccaaa	aggctgggaatccatacacaga
<i>Cyp1a2</i>	NM_012541	tgaggactcagtccttcctca	ggacaacttgtaaggatcagctctct
<i>Cyp2b2</i>	XM_001062335	ctccgctatggtttctctgct	agggatggtggcctgtga
<i>Cyp3a1</i>	NM_013105	ttctgcaaaacttctcctccag	ctttagaataatgggtttgtggttg
<i>Cyp3a2</i>	NM_153312	ttctccttcagccttgca	caataaaattccttgagggaagtcag

Tableau 14: Séquences des primers utilisés dans le chapitre 3

b. Mécanismes moléculaires de la perturbation thyroïdienne engendrée par un traitement au fipronil

L'extraction des ARN hépatiques totaux et la transcription réverse ont été réalisées selon le protocole décrit ci-dessus. Les RT-qPCR ont été réalisées en utilisant du SYBR Green (SYBR Green TaqMan Universal PCR master mix, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). La fluorescence a été mesurée et analysée (Viia7 detection system instrument, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) et les données ont été normalisées par l'expression de l'ARNm de la TATA-box binding protein (*Tbp*) et par l'expression de celui de la Polymerase II polypeptide A (*Polr2a*). Les résultats ont été exprimés selon l'équation

suivante: $\frac{2^{(Ct_{Calib} - Ct_{gene})_{sample}}}{\text{mean}[2^{(Ct_{Calib} - Ct_{gene})_{vehicle\ group}}]}$, où Ct correspond au nombre de cycles

permettant d'obtenir un signal fluorescent au-dessus d'un seuil prédéfini et Ct Calib correspond à la moyenne des Ct obtenus pour *Tbp* et *Polr2a*. Toutes les amorces des gènes présentés dans le chapitre 5 sont regroupées dans les tableaux 15 (Rat) et 16 (Souris) et leur efficacité a été testée.

Gène	NCBI Refseq	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>Tbp</i>	NM_001004198	ccacaccagcctctgagagc	agccaagattcacggtggat
<i>Polr2a</i>	XM_002727723	cggcgctcctgagtcgg	aacttgggggactaatggatcc
<i>Car</i>	NM_022941	gagtataaacagcgcatactcatatgaaa	ctgggcctcagctgcaa
<i>Pxr</i>	NM_052980	aggacacgcaccccttgg	ccgtccgtgctgctgaat
<i>Cyp2b1</i>	NM_001134844	gcactgaaaaagagtgaagctttc	ggaacaattcatttcgggca
<i>Cyp2b2</i>	NM_01198676	ctccgctatggttctctgct	agggatgggtggcctgtga
<i>Cyp3a1</i>	NM_013105	ttctgcaaaacttctccttccag	ctttagaataatgggttttgttggtg
<i>Ces2</i>	NM_001044258	gaaacaaattcacgctcggc	gcccagtatctggcctgtgt
<i>Ces6</i>	NM_144743	ctctgataaatctgaggtggctacaag	catccagataggtggctactgtctt
<i>Ugt1a1</i>	NM_012683	cttcagaaaaaagccctatccca	ccaaagagaaaaccacgatgc
<i>Sult1b1</i>	NM_022513	gaacaaaatgttctggagcaag	tgatggagtttcttcaagagtcaa
<i>Gsta2</i>	NM_017013	ggtaatatgtccccagaccaa	ccgggtcagcctgttacct
<i>Abcc2</i>	NM_012833	cccattatccgtgccttga	tccagccgaattgcaagc
<i>Abcc3</i>	NM_080581	gggagctgggctccaagt	ggaacccaggccagcaa
<i>Abcg5</i>	NM_053754	tctccttgatcatcgagagtggc	cgtccagcagcgtggttt
<i>Abcg8</i>	NM_130414	accaactgtggaactgctgct	ccggaagtcattggaaatctg
<i>Slco1a1</i>	NM_017111	agattagacttctcactcctgtgtcatt	taataacctgattaagttgtcagtgctc
<i>Slco1a4</i>	NM_131906	aactttcctattgcagaaatatcatttaga	tgcagaggataaatcaaaacaaactaac
<i>Cyp4a1</i>	NM_175837	ccactatgacattctgaaacctatgta	tgccagctgttcccatttg
<i>Cd36</i>	NM_031561	ggaggcattctcatgccg	tgaaagcaatgggtccttcttca
<i>Hmgcs2</i>	NM_173094	caacgctgccaactggatg	gggcgttaccactgggtaga
<i>Thrsp</i>	NM_012703	tccatcacatccttaccacc	gggtcctcatcgtcttcct

Tableau 15: Séquences des primers utilisés dans le chapitre 5 chez le rat

Gène	NCBI Refseq	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>Tbp</i>	NM_013684	acttcgtgcaagaaatgctgaa	gcagttgtccgtggctctct
<i>Polr2a</i>	NM_009089	aagagagtgcagttcggagtcct	tccgttgtttctgggtatttga
<i>Car</i>	NM_009803	gctgcaagggcttcttcaga	ccttcagcaaacggacaga
<i>Pxr</i>	NM_010936	agagatcatccctcttctgccac	gatctggctctcaataggcaggt
<i>Cyp2b10</i>	NM_009999	tttctgcccttctcaacaggaa	atggacgtgaagaaaaggaacaac
<i>Cyp3a11</i>	NM_007818	tcacacacacagttgtaggcagaa	gtttacgagtcctcatatcggtagag
<i>Ces2c</i>	NM_145603	cgggctgctgcttcttcttat	ctgtatgtgtgttctgatgggt
<i>Ces2a</i>	NM_001190330	tcctgctgtgacactctcatgtg	ccaaccaggaagtctagccaa
<i>Ugt1a1</i>	NM_201645	tcagagaactttatgtgcagagtgg	catgctccccagaggcg
<i>Sult1b1</i>	NM_019878	gggtacattgtaataaccacttacct	gggtataacatctctcttacattttcaac
<i>Gsta2</i>	NM_008182	cacactcctctggagctggat	cccgggcattgaagtagtga
<i>Abcc2</i>	NM_013806	cctgaatctcacgcgccta	cagatggagtccagacatgctg
<i>Abcc3</i>	NM_029600	tcttgctgataccactcaatgga	gcgggagtccttgaacttcat
<i>Abcg5</i>	NM_031884	tcgccacggctattttca	gccaaaagagcagcagagaaata
<i>Abcg8</i>	NM_026180	atccattggccacccttgt	gcgtctgtcgatgctggtc
<i>Slco1a1</i>	NM_013797	gttgcaacacaagaaggcagatt	atttggctaggtatgcacatgttaat
<i>Slco1a4</i>	NM_030687	tatggaaaatccactgctgagatagtc	aatcaaaccaccaattaaatatccg
<i>Cyp4a10</i>	NM_010011	attagtgcagagtgcagcagcaacag	tgtctgcaaactcgggttgg
<i>Cd36</i>	NM_007643	gttaacaaagaggtccttacacatacag	cagtgaaggctcaaagatggc
<i>Hmgcs2</i>	NM_008256	tgcaggaaacttcgctcaca	aaatagacctccagggaagga
<i>Thrsp</i>	NM_009381	aacggaggaggccgaagaag	gttgatgcacctcggggtct
<i>Cyp2c29</i>	NM_007815	gctcaaagcctactgtca	catgagtgtaaatcgctca
<i>Cyp4a14</i>	NM_007822	tcagtctatttctgggtgctgttc	gagctccttgccttcagatgg
<i>Sult1c2</i>	NM_026935	aatgggtgatgtagagaagtccg	ggaagatgggtccttaatatccttg
<i>Sult1d1</i>	NM_016771	gatgacattttgatctccacatatcc	cccattgtttagatcaaataccagta
<i>Sult1e1</i>	NM_023135	atttcacttcttcacgggaac	ccaaaaacttcataatactcaggcatag
<i>Ugt1a2</i>	NM_201645	tccttcctcttatattccgaacctac	gaaaacaacgatgccatgctc
<i>Ugt1a6</i>	NM_145079	gctacctagaggcacaggtctctaac	aagtgtctgagcagcaggaagaa
<i>Ugt1a9</i>	NM_201644	aagaacatgcattttgctcctactt	tctgtcatagtactggggtctga
<i>Ugt2b1</i>	NM_152811	gttttctctgggatcaatggttaaa	tttcttaccatcaaactctccacagaac
<i>Ugt2b5</i>	NM_009467	ccattgcaaacctgctaaacc	actaaccattgaccaagagaaaaga
<i>Abcb1a</i>	NM_011076	catgacagatagctttgcaagtgtag	ggcaaacatggctcttttatcg
<i>Slco1b2</i>	NM_020495	gacaaggcactgcatgga	gccttgcatatgtagctgaatga
<i>Dio1</i>	NM_007860	ctttgcctccacagccga	acgttgttcttaaaagcccagc
<i>Dio3</i>	NM_172119	tttagatttctgtgcatccgc	ttcgggctcagggtggt

Tableau 16: Séquences des primers utilisés dans le chapitre 5 chez la souris

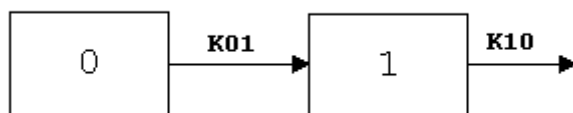
4. Analyses pharmacocinétiques

Toutes les analyses pharmacocinétiques ont été réalisées en utilisant le logiciel WinNonlin® (WinNonlin® 5.3, Pharsight Corporation, CA, USA). Le choix du modèle a été guidé par le critère d'Akaike (Yamaoka *et al.*, 1978) et le choix de la pondération des données par observation de la distribution des résiduelles (valeurs prédites vs. valeurs observées) qui doit être homogène et aléatoire.

Les analyses pharmacocinétiques de l'évolution temporelle des concentrations plasmatiques en fipronil et en fipronil sulfone sont présentées dans le chapitre 2. Les analyses pharmacocinétiques de l'évolution temporelle des concentrations plasmatiques ou extracellulaires en T₄ et des concentrations plasmatiques en antipyrine, plus classiques, sont décrites dans ce chapitre.

a. Thyroxine et antipyrine *in vivo*

L'évolution temporelle des concentrations plasmatiques en TT₄, FT₄ ou en antipyrine chez des rates ayant reçu un bolus ip de T₄ ou d'antipyrine (chapitre 3), et celle des concentrations plasmatiques en ¹³C₆-LT₄ chez des souris ayant reçu un bolus ip de ¹³C₆-LT₄ (chapitre 5), ont été ajustées avec la méthode des moindres carrés selon une équation biexponentielle correspondant à un modèle monocompartimental avec une phase d'absorption et une phase d'élimination d'ordre 1:



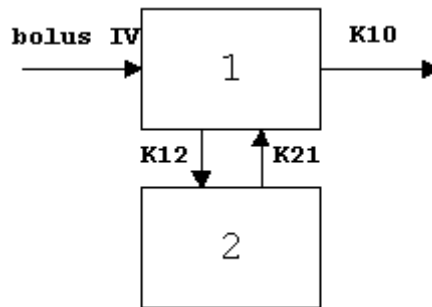
$$C(t) = \frac{F \times D \times K_{01}}{V \times (K_{01} - K_{10})} \times (\exp(-K_{10} \times t) - \exp(-K_{01} \times t))$$

où C(t) est la concentration plasmatique au temps t, F est la biodisponibilité de la substance, D est la dose, V est le volume de distribution, K₀₁ est la constante de vitesse d'absorption d'ordre 1 et K₁₀ est la constante de vitesse d'élimination d'ordre 1. Les données ont été pondérées par l'inverse des valeurs estimées pour la FT₄ et la ¹³C₆-LT₄ et une pondération uniforme a été appliquée pour la TT₄ et l'antipyrine.

b. Thyroxine *in vitro*

L'évolution temporelle des concentrations en TT₄ dans le milieu extracellulaire des cultures d'hépatocytes (chapitre 4) a été ajustée avec la méthode des moindres carrés selon une équation biexponentielle correspondant à un modèle bicompartimental après

administration d'un bolus intraveineux, l'administration de T_4 aux hépatocytes pouvant être assimilée à une administration iv:



$$C(t) = A * \exp(-\alpha * t) + B * \exp(-\beta * t)$$

où $C(t)$ est la concentration dans le milieu de culture au temps t , A est le coefficient du 1^{er} terme exponentiel, B est le coefficient du 2^{ème} terme exponentiel, α est la constante de vitesse d'ordre 1 de la 1^{ère} phase de décroissance et β est la constante de vitesse d'ordre 1 de la 2^{ème} phase de décroissance des concentrations en T_4 . Une pondération uniforme a été appliquée aux données obtenues lors de l'étude des effets de l'inhibition de la biotransformation du fipronil sur hépatocytes de rat. Les données ont été pondérées par l'inverse des valeurs estimées lors de l'étude des différences interspécifiques sur hépatocytes de rat, de mouton et d'Homme.

5. Analyses statistiques

Toutes les données ont été analysées à l'aide du logiciel R® (R® 2.6.2, R Development Core Team, Vienna, Austria). Les données obtenues à l'aide des puces à ADN lors de l'étude du transcriptome hépatique de rat (chapitre 5) ont été analysées à l'aide de packages Bioconductor (www.bioconductor.org). Le détail du prétraitement et du traitement des données est stocké dans la base de données Gene Expression Omnibus (GEO) sous la référence GSE39378. Les gènes différentiellement exprimés entre le groupe solvant et le groupe fipronil ont été identifiés à l'aide des packages limma et q-value. Ils ont été considérés comme significativement différentiellement exprimés lorsque la q-value était inférieure ou égale à 10%. Toutes les autres données ont été analysées par une ANOVA avec les facteurs appropriés comme facteurs à effet fixe (traitement et/ou génotype et/ou leur interaction quand elles étaient estimables) suivi de comparaisons post-hoc (test de Bonferroni, chapitres 3) ou d'un test de Student (chapitres 4 et 5). Pour l'analyse des effets du traitement et du génotype sur la clairance de la $^{13}\text{C}_6\text{-LT}_4$ chez la souris (chapitre 5), les facteurs à effet fixe ont été corrigés par l'inverse du coefficient de variation des clairances estimées.

CHAPITRE 2: CARACTERISATION DE L'EXPOSITION AU FIPRONIL ET AU FIPRONIL SULFONE PAR VOIE ORALE CHEZ LE RAT

A.Problématique, hypothèses et objectifs

A ce jour, il y a peu de données concernant la pharmacocinétique du fipronil. Elles sont essentiellement issues des évaluations toxicologiques réglementaires (AFSSA, 2005), de l'ingestion accidentelle de fipronil chez l'Homme (Mohamed *et al.*, 2004) ou des expérimentations réalisées précédemment dans le laboratoire (Leghait *et al.*, 2009; Leghait *et al.*, 2010) et suggèrent qu'il existe des différences interspécifiques en termes de perturbation thyroïdienne engendrée par un traitement au fipronil. Ces différences interspécifiques pourraient être dues au potentiel rôle perturbateur thyroïdien du principal métabolite du fipronil formé *in vivo*, le fipronil sulfone. En effet, le rat, qui est très sensible à la perturbation thyroïdienne, est fortement exposé au fipronil sulfone (Leghait *et al.*, 2009). De plus, le fipronil n'a quasiment pas d'effet perturbateur thyroïdien chez le mouton, espèce beaucoup moins exposé au fipronil sulfone (Leghait *et al.*, 2010). Cependant, le potentiel effet perturbateur thyroïdien du fipronil sulfone n'a pas été envisagé dans les évaluations toxicologiques réglementaires et la pharmacocinétique du métabolite n'a pas été renseignée. Ceci est d'autant plus critique que les données obtenues chez le rat et le mouton suggèrent que le fipronil sulfone persiste plus longtemps dans l'organisme que le fipronil lui-même.

Le but des expérimentations de ce chapitre était donc de déterminer les paramètres pharmacocinétiques du fipronil et du fipronil sulfone afin de mieux caractériser l'exposition interne au fipronil et au fipronil sulfone par voie orale chez le rat.

Pour cela, nous avons tout d'abord observé l'évolution de l'exposition au fipronil et au fipronil sulfone chez des rates traitées au fipronil quotidiennement pendant 14 jours afin de documenter la pharmacocinétique du fipronil dans les conditions d'exposition permettant d'obtenir un effet perturbateur thyroïdien du fipronil (expérimentation 1). Ensuite, nous avons administré à des rates du fipronil et du fipronil sulfone par voie orale et par voie intraveineuse afin de déterminer les paramètres pharmacocinétiques du fipronil en fipronil sulfone et en particulier le taux de biotransformation de l'insecticide en son métabolite, et ainsi être en mesure de définir un schéma posologique permettant d'exposer des rats aux mêmes concentrations en fipronil sulfone après un traitement au fipronil ou au fipronil sulfone seul (expérimentation 2). Enfin, nous avons tenté d'inhiber cette biotransformation à l'aide d'un inhibiteur compétitif des cytochromes P450 hépatiques (CYP) responsables de la métabolisation du fipronil en fipronil sulfone afin d'exposer des rats majoritairement au fipronil et ainsi de discriminer les effets perturbateurs thyroïdiens propres à la molécule mère de ceux dus à son métabolite (expérimentations 3 et 4).

B. Evolution des concentrations plasmatiques en fipronil et en fipronil sulfone après des administrations répétées de fipronil

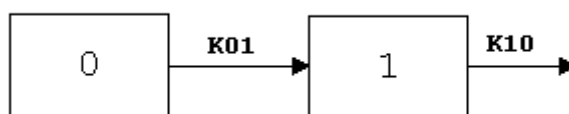
1. Matériels et méthodes

a. Plan expérimental

La phase animale a été réalisée par Julien Leghait au cours de sa thèse. Nous avons ensuite repris les données générées pour les modéliser et préciser les paramètres pharmacocinétiques du fipronil et leur évolution temporelle lors d'administrations répétées de la molécule. Trois rates ont été utilisées pour cette expérimentation. Leur poids moyen ($\pm$ ET) était de 280 ± 14 g lors de la première administration de fipronil et de 274 ± 17 g lors de la dernière administration. Les rates ont reçu une administration quotidienne de fipronil (3 mg/kg/jour, 14 jours) par gavage oro-gastrique. Afin de déterminer l'évolution temporelle des concentrations plasmatiques en fipronil et en fipronil sulfone, des prélèvements sanguins ont été effectués 2, 5, 8 et 24h après la première administration, 24h après la troisième, 4h après la dixième et 2, 5, 8, 24 et 100h après la dernière administration de fipronil.

b. Analyse pharmacocinétique

L'évolution temporelle des concentrations plasmatiques en fipronil a été ajustée avec la méthode des moindres carrés selon une équation biexponentielle correspondant à un modèle monocompartimental avec une phase d'absorption et une phase d'élimination d'ordre 1:



$$C(t) = \frac{F \times D \times K_{01}}{V \times (K_{01} - K_{10})} \times (\exp(-K_{10} \times t) - \exp(-K_{01} \times t)) \text{ avec } K_{10} = Cl/V$$

où $C(t)$ est la concentration plasmatique au temps t , F est la biodisponibilité de la substance, D est la dose, V est le volume de distribution, K_{01} est la constante de vitesse d'absorption d'ordre 1, K_{10} est la constante de vitesse d'élimination d'ordre 1 et Cl est la clairance apparente du fipronil. La clairance apparente du fipronil a été considérée comme une variable temps-dépendante, telle que clairance apparente = $a + bt$, où a (mL/min/kg) était la clairance apparente initiale, b (mL/min/kg/h) est le paramètre décrivant la temps-dépendance de la clairance apparente, et t (h) était le temps auquel la clairance

apparente a été calculée. Enfin, les données ont été pondérées par l'inverse des valeurs estimées.

2. Résultats

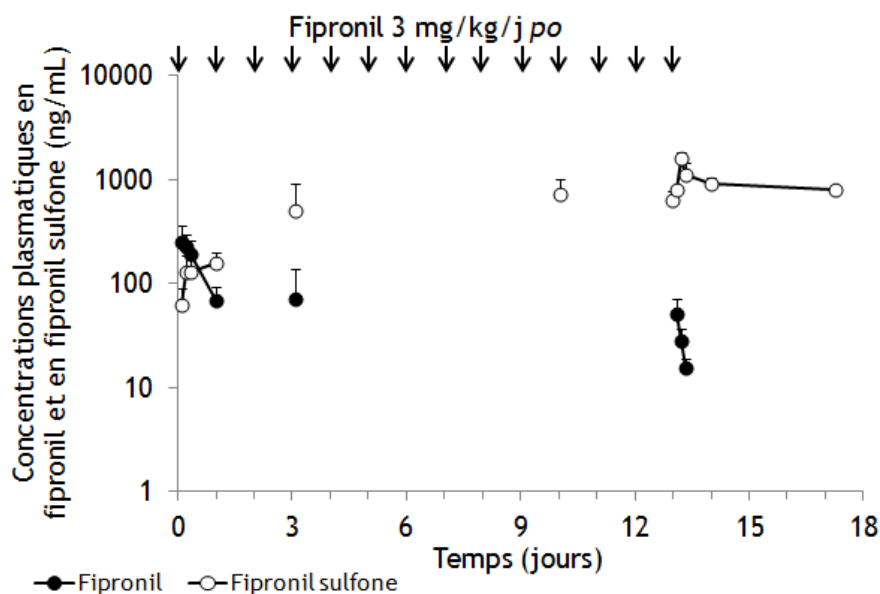


Figure 12: Evolution des concentrations plasmatiques moyennes ($\pm$ ET) en fipronil et en fipronil sulfone après des administrations répétées de fipronil à des rates par voie orale.

Le fipronil a été administré pendant 14 jours à 3 rates à une dose de 3 mg/kg/j par gavage oro-gastrique. Les concentrations plasmatiques en fipronil (●) et en fipronil sulfone (○) ont été mesurées dans les prélèvements sanguins collectés 2, 5, 8 et 24h après la 1ère administration de fipronil, 24h après la 3ème administration, 24h après la 10ème administration et 2, 5, 8, 24 et 100h après la dernière administration.

Vingt-quatre heures après la 1ère et la 3ème administration, les concentrations plasmatiques en fipronil ont atteint respectivement 68 ng/mL et 71 ng/mL (figure 12). A l'inverse, 24h après la 10ème et la dernière administration, les concentrations plasmatiques en fipronil étaient inférieures à la limite de quantification de 5 ng/mL, soulignant le fait que l'évolution des concentrations plasmatiques en fipronil suite aux administrations répétées était temps-dépendante. Le fipronil sulfone était détectable dès 2h après la 1ère administration de fipronil. Les concentrations plasmatiques en fipronil sulfone minimales, c'est-à-dire 24h après une administration de fipronil et juste avant la suivante, augmentaient progressivement. Un état d'équilibre, caractérisé par des concentrations en fipronil sulfone stables, semblait atteint après la 4ème administration de fipronil. Après la dernière administration, les concentrations plasmatiques en fipronil sulfone diminuaient plus lentement que celles en fipronil. Ainsi, 100h après la dernière administration de fipronil, le fipronil sulfone était toujours détectable chez tous les animaux alors que le fipronil n'était plus détectable 8h après cette dernière administration.

L'ajustement des données montrait des fluctuations importantes des concentrations plasmatiques en fipronil suite aux administrations répétées. Cependant, l'amplitude de ces fluctuations diminuait progressivement de la 1^{ère} à la dernière administration suggérant que la clairance du fipronil augmentait au cours du temps (figure 13).

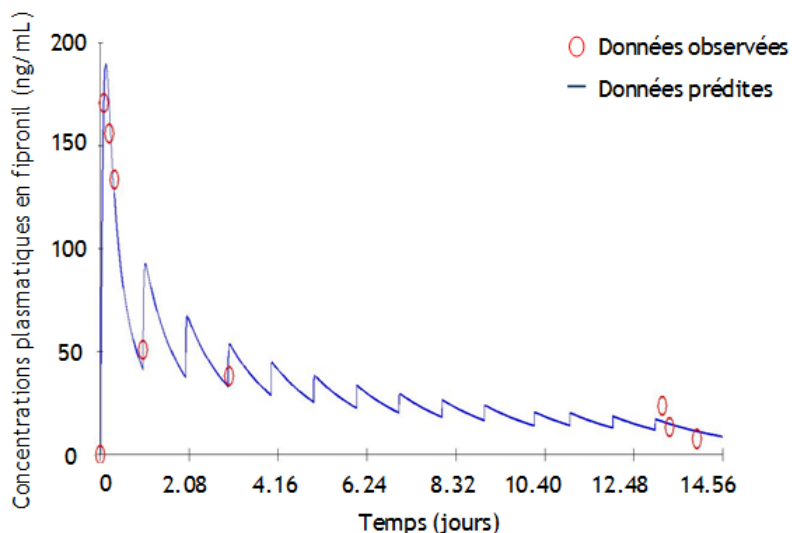


Figure 13: Exemple représentatif pour une des rates d'ajustement de l'évolution des concentrations plasmatiques en fipronil après des administrations répétées de fipronil par voie orale.

Ce graphique est représentatif des concentrations plasmatiques en fipronil observées (0) et prédites par le modèle pharmacocinétique (–) pour une des rates.

Ainsi, lors de la dernière administration, la C_{max} était 7.6 fois plus faible, la clairance apparente 10 fois plus élevée et le temps de demi-vie 10 fois plus court que lors de la 1^{ère} administration (tableau 17).

	1 ^{ère} administration de fipronil	14 ^{ème} administration de fipronil
C_{max} (ng/mL)	599 ± 145	79 ± 42
T_{max} (h)	12.60 ± 1.24	2.33 ± 0.48
AUC_{0-24h} (ng.h/mL)	34087 ± 7839	2856 ± 582
$t_{1/2}$ (h)	4.02 ± 1.88	0.38 ± 0.18
Clairance apparente (mL/min/kg)	11.80 ± 6.17	127.93 ± 71.89
a (mL/min/kg)		2.87 ± 1.61
b (mL/min/kg/h)		0.37 ± 0.21

Tableau 17: Paramètres pharmacocinétiques moyens (± ET) du fipronil lors d'une administration répétée de fipronil à des rates par voie orale.

Les paramètres pharmacocinétiques du fipronil ont été estimés à l'aide d'un modèle monocompartimental avec une phase d'absorption et une phase d'élimination d'ordre 1 en considérant la clairance apparente du fipronil comme une variable temps-dépendante.

3. Conclusion

Les rates étaient majoritairement exposées au fipronil sulfone lors d'administrations répétées de fipronil. De plus, la formation de fipronil sulfone à partir de fipronil était de plus en plus rapide, suggérant une activation des CYP par le fipronil de plus en plus importante au cours du temps. Enfin, le fipronil sulfone persistait plus longtemps dans l'organisme que le fipronil lui-même. En effet, durant les 14 jours d'administration, l'exposition au fipronil n'excédait pas quelques heures à des niveaux de concentrations plasmatiques faibles alors que les concentrations plasmatiques en fipronil sulfone atteignaient rapidement un état d'équilibre. A la vue de ces premiers résultats, on pouvait donc supposer que le taux de biotransformation du fipronil en fipronil sulfone était proche de 100%. Cette hypothèse a été mise à l'épreuve dans l'expérimentation suivante.

C.Paramètres pharmacocinétiques du fipronil et du fipronil sulfone après une administration unique de fipronil ou de fipronil sulfone

1. Matériels et méthodes

a. Plan expérimental

Douze rates ont été utilisées pour cette expérimentation. Leur poids moyen ($\pm$ ET) était de 239 ± 25 g lors de l'administration de fipronil ou de fipronil sulfone. Les animaux ont été répartis en quatre groupes: administration iv de fipronil, administration iv de fipronil sulfone, administration po de fipronil, administration po de fipronil sulfone ($n = 3$ rates/groupe). La dose de fipronil était de 1.5 mg/kg et celle de fipronil sulfone de 1.55 mg/kg quelle que soit la voie d'administration (iv dans la veine caudale ou po par gavage oro-gastrique) afin de traiter les animaux avec des doses équimolaires de fipronil et de fipronil sulfone ($3.4 \mu\text{moles/kg}$). Afin de déterminer l'évolution temporelle des concentrations plasmatiques en fipronil et en fipronil sulfone, des prélèvements sanguins ont été effectués la veille de la cinétique et 0.25, 0.5, 2, 6, 10, 24, 48 et 120h après un bolus iv de fipronil ou de fipronil sulfone, ou la veille de la cinétique et 1, 2, 6, 10, 24, 34, 48 et 120h après un bolus po de fipronil ou de fipronil sulfone.

b. Analyse pharmacocinétique

La détermination des paramètres pharmacocinétiques du fipronil et du fipronil sulfone a été faite à l'aide d'une analyse noncompartimentale. Les AUC (Area Under the Curve, soit l'aire sous la courbe des concentrations) ont été calculées entre 0 et 120 h après une administration de fipronil ou de fipronil sulfone et ont été utilisées pour la détermination des paramètres pharmacocinétiques du fipronil et de son métabolite. La biodisponibilité par voie orale du fipronil (F_{fip}) ou du fipronil sulfone (F_{sulf}) a été déterminée grâce à l'équation suivante:

$$F_{\text{molecule}}(\%) = \frac{\text{AUC}_{\text{molecule après son administration par voie orale}}}{\text{AUC}_{\text{molecule après son administration par voie iv}}} \times \frac{\text{Dose}_{\text{iv}}}{\text{Dose}_{\text{po}}} \times 100$$

Le taux de biotransformation du fipronil en fipronil sulfone (Weiss, 1988; Weiss, 1990) par voie intraveineuse ($T_{\text{biotransformation iv}}$) a été calculé selon l'équation suivante:

$$T_{\text{biotransformation iv}}(\%) = \frac{\text{Dose}_{\text{sulfone iv}}}{\text{AUC}_{\text{fipronil sulfone après fipronil sulfone iv}}} \times \frac{\text{AUC}_{\text{fipronil sulfone après fipronil iv}}}{\text{Dose}_{\text{fipronil iv}}} \times 100$$

où $\frac{\text{Dose}_{\text{sulfone iv}}}{\text{AUC}_{\text{fipronil sulfone après fipronil sulfone iv}}}$ représentait la clairance plasmatique du fipronil sulfone. Les doses ont été exprimées en $\mu\text{moles/kg}$ et non en mg/kg .

2. Résultats

Lors de l'administration de fipronil par voie orale, la concentration maximale était rapidement atteinte et équivalente à celle obtenue lors d'une administration par voie intraveineuse, suggérant une absorption rapide et quasi-totale du fipronil (figure 14, graphiques du haut). Les concentrations plasmatiques en fipronil diminuaient rapidement après une administration intraveineuse ou par voie orale de la molécule jusqu'à atteindre des concentrations proches ou inférieures à la LOQ du dosage de 2.5 ng/mL dès 48h après l'administration de fipronil. Les concentrations plasmatiques en fipronil sulfone après une administration de fipronil par voie intraveineuse (aire grisée, graphique A en bas) augmentaient progressivement jusqu'à atteindre des concentrations maximales dès 24h après l'administration. Les concentrations plasmatiques en fipronil sulfone après une administration de fipronil sulfone par voie intraveineuse (courbe, graphique A en bas) diminuaient quant à elles très lentement jusqu'à atteindre des concentrations plasmatiques stables et proches de celles obtenues après l'administration de fipronil. Après administration du fipronil par voie intraveineuse, le taux de biotransformation du fipronil en fipronil sulfone a alors été estimé à 75%. Le décours temporel des concentrations plasmatiques en fipronil sulfone après une administration de fipronil ou de fipronil sulfone par voie orale (graphique B en bas) étaient très similaires et conduisaient à des concentrations plasmatiques à la fin des cinétiques proches de celles observées lors d'une administration de fipronil ou de fipronil sulfone par voie intraveineuse. Enfin, la biodisponibilité du fipronil par voie orale a été estimée à 84%. Celle du fipronil sulfone était d'environ 100%, suggérant d'une part que, comme le fipronil (AFSSA, 2005), le fipronil sulfone était bien absorbé par voie orale, et d'autre part que le fipronil sulfone était réabsorbé et/ou très peu métabolisé.

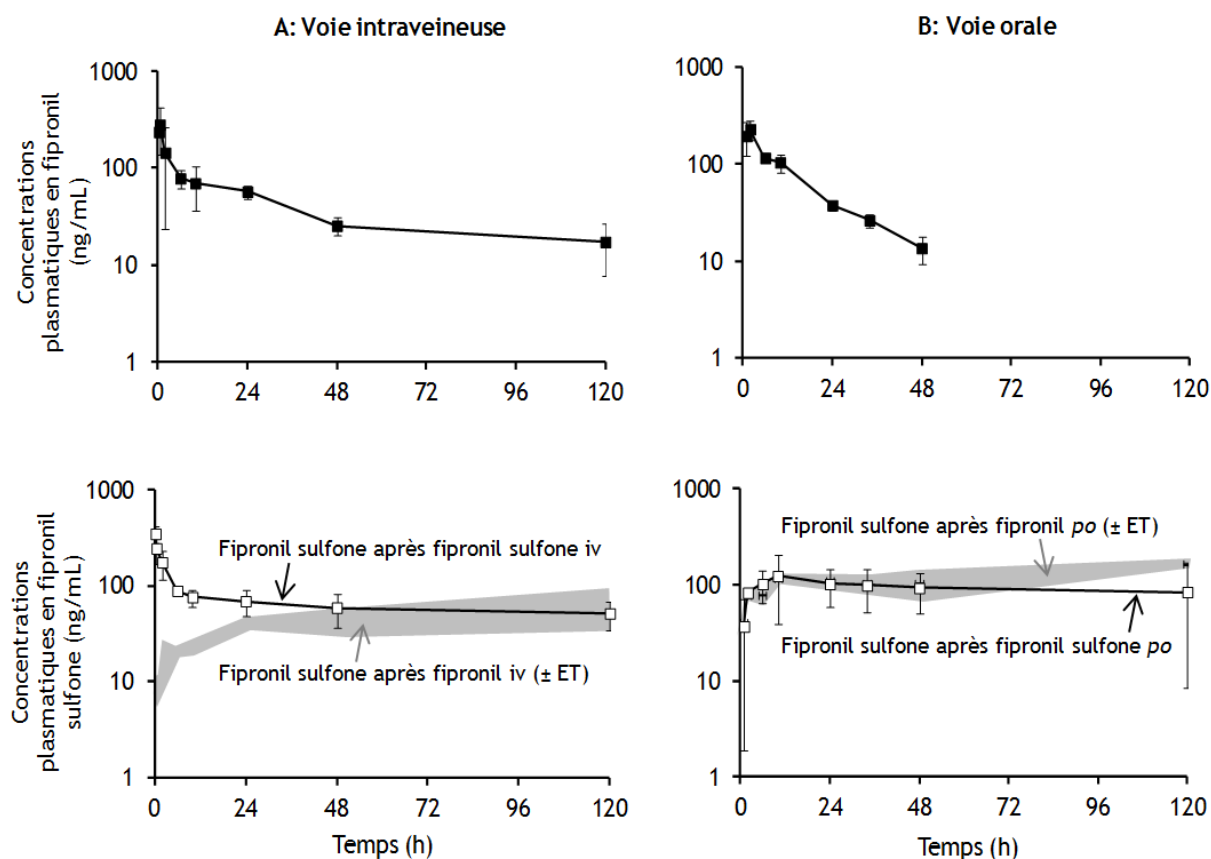


Figure 14: Evolution des concentrations plasmatiques moyennes ($\pm$ ET) en fipronil et en fipronil sulfone après une administration unique de fipronil ou de fipronil sulfone à des rates par voie iv ou par voie orale.

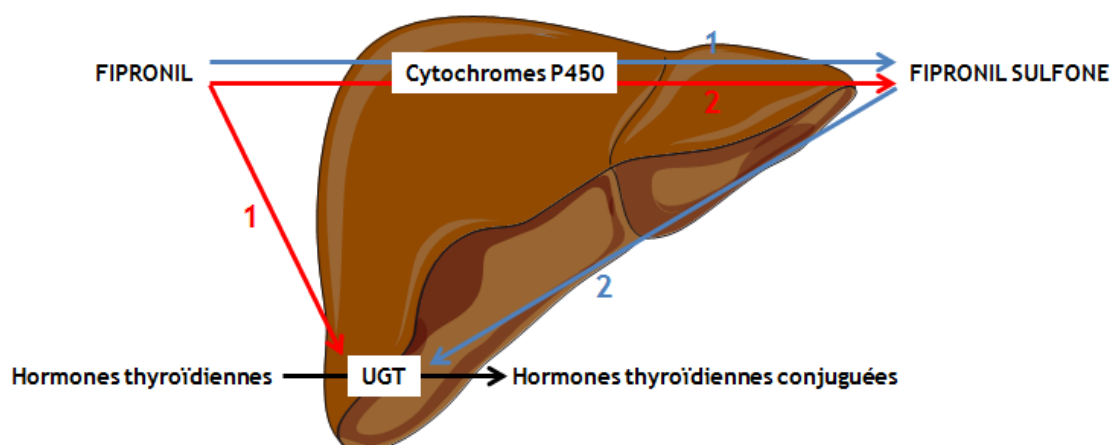
Le fipronil ou le fipronil sulfone ont été administrés à une dose de 3.4 μ moles/kg (1.5 mg/kg pour le fipronil et 1.55 mg/kg pour le fipronil sulfone) par voie iv (A) ou par voie orale (B) à des rates (3/groupe). Les concentrations plasmatiques en fipronil (graphiques du haut, ■) et en fipronil sulfone (graphiques du bas, □) après une administration de fipronil ou de fipronil sulfone ont été mesurées dans les prélèvements sanguins collectés la veille, 0.25, 0.5, 2, 6, 10, 24, 48 et 120h après les administrations iv et la veille, 1, 2, 6, 10, 24, 34, 48 et 120h après les administrations po. Dans les graphiques du bas, les aires grisées représentent les concentrations plasmatiques moyennes ($\pm$ ET) en fipronil sulfone observées après une administration de fipronil par la même voie.

3. Conclusions

Comme lors d'administrations répétées de fipronil, les rats ont été rapidement et majoritairement exposés au fipronil sulfone lors d'une administration unique de la molécule parente. Le taux de biotransformation du fipronil en fipronil sulfone a de plus été estimé à 75%. Cela est cohérent avec les études menées chez le rat ayant reçu un bolus po de 14 C-fipronil (10 mg/kg), 90% de la radioactivité ayant été retrouvée sous forme de fipronil sulfone et non de fipronil (Cravedi *et al.*, *Under Review*). De plus, il est à noter que les concentrations plasmatiques en fipronil sulfone, quelle que soit la molécule administrée ou la voie d'administration, restaient stables ou diminuaient très lentement. Ce faible taux d'élimination du fipronil sulfone a été retrouvé dans l'étude de Cravedi *et*

al., (Under Review) et suggère l'existence d'une recirculation entérohépatique qui pourrait différer l'élimination du métabolite. L'étude de l'effet perturbateur thyroïdien du fipronil sulfone est donc d'autant plus critique que le métabolite semble être très lentement éliminé par l'organisme.

Les résultats antérieurs obtenus au laboratoire suggéraient que les effets perturbateurs thyroïdiens du fipronil pouvaient être dus au fipronil sulfone (hypothèse 2, figure 15). Toutefois, rien ne permettait d'exclure que ces effets pouvaient être dus à l'effet du fipronil lui-même avant sa biotransformation en fipronil sulfone (hypothèse 1, figure 15).



Hypothèse 1: le fipronil a un effet perturbateur thyroïdien avant sa transformation en fipronil sulfone
Hypothèse 2: le fipronil a un effet perturbateur thyroïdien après sa transformation en fipronil sulfone

Figure 15: Hypothèse d'un effet perturbateur thyroïdien du fipronil sulfone

Afin de pouvoir discriminer ces deux hypothèses, il était nécessaire de pouvoir disposer d'un modèle permettant 1) d'obtenir une exposition exclusive au fipronil sulfone et 2) de bloquer la biotransformation du fipronil en fipronil sulfone pour obtenir une exposition exclusive au fipronil. A l'issue de ces deux premières expérimentations, nous avons définis les modalités de traitement permettant de tester l'hypothèse 2. Dans les deux expérimentations suivantes nous avons tenté d'inhiber la biotransformation du fipronil en fipronil sulfone à l'aide d'un inhibiteur compétitif des CYP, le piperonyl butoxide, afin d'être en mesure de tester l'hypothèse 1.

D.Essai de réduction de la biotransformation du fipronil en fipronil sulfone avec une dose unique de piperonyl butoxide

1. Matériels et méthodes

Les essais d'inhibition de la biotransformation du fipronil en fipronil sulfone afin de limiter l'exposition interne au fipronil par blocage de la biotransformation en fipronil sulfone ont été réalisés en traitant conjointement les animaux au fipronil et à un inhibiteur compétitif reconnu des cytochromes P450, le piperonyl butoxide. Cette molécule présentait également l'avantage d'être une substance modérément toxique de façon aiguë chez les mammifères avec une DL_{50} par voie orale chez le rat de 11500 mg/kg (Institut National de Santé Publique du Québec, 2002).

Chez le rat, la NOAEL du piperonyl butoxide sur le métabolisme de l'antipyrine, marqueur de l'activité des cytochromes P450, a été fixée à 100 mg/kg (Caroldi, 1992), la LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level) lors des études de toxicité chronique a été fixée à 500 mg/kg/j (Institut National de Santé Publique de Québec, 2002) et les études du métabolisme du piperonyl butoxide ont été faites après une administration par voie orale de 500 mg/kg (Byard and Needham, 2006). La dose de piperonyl butoxide choisie était donc de 500 mg/kg/j. Cette dose a été administrée quotidiennement par gavage oro-gastrique à 4 rates pendant 10 jours conjointement à une dose de 3 mg/kg/j de fipronil. Les concentrations plasmatiques en fipronil et en fipronil sulfone ont été déterminées juste après la dernière administration.

2. Résultats

Lors d'administrations de piperonyl butoxide, les concentrations plasmatiques en fipronil sulfone étaient largement supérieures à celles en fipronil à la fin de l'expérimentation avec un rapport fipronil sulfone/fipronil de 140 ± 114 (figure 16), rapport proche de celui obtenu à la fin de l'expérimentation lors d'administrations répétées de fipronil (127 ± 27). Il est à noter que le solvant utilisé lors des deux expérimentations n'est pas le même (méthylcellulose vs huile de maïs). Cependant, l'administration de 500 mg/kg/j de piperonyl butoxide ne semblait pas modifier significativement le rapport fipronil sulfone/fipronil obtenu lors d'une administration de fipronil seul.

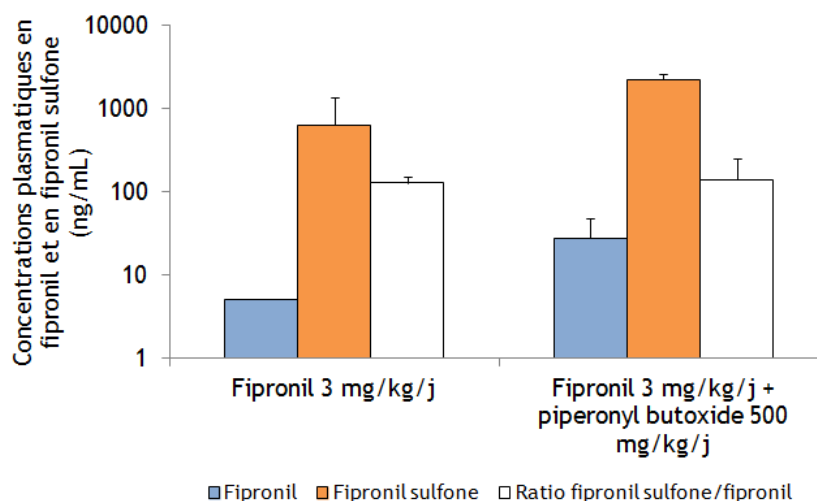


Figure 16: Concentrations plasmatiques moyennes ($\pm$ ET) en fipronil et en fipronil sulfone après administration à des rates de fipronil et d'une dose de piperonyl butoxide par voie orale.

Le fipronil a été administré à une dose de 3 mg/kg/j pendant 10 jours par voie orale à 4 rates conjointement à 500 mg/kg/j de piperonyl butoxide. Les concentrations plasmatiques en fipronil et en fipronil sulfone chez les rates traitées 14 jours au fipronil à 3 mg/kg/j par voie orale sont rappelées à gauche sur cette figure. Les concentrations plasmatiques en fipronil (bleu) et en fipronil sulfone (orange) ont été mesurées juste après la dernière administration de fipronil. Le rapport fipronil sulfone/fipronil est représenté par les histogrammes blancs.

3. Conclusions

Le traitement des rats avec 500 mg/kg/j de piperonyl butoxide conjointement à l'administration répétée de fipronil n'a pas permis de bloquer la biotransformation du fipronil en fipronil sulfone. Le fipronil est décrit comme un inducteur des CYP (Das *et al.*, 2006). Lors d'administrations répétées de fipronil, la formation de fipronil sulfone à partir de fipronil était de plus en plus rapide, ce qui suggérait une activation des CYP par le fipronil de plus en plus importante au cours du temps. Il est donc envisageable qu'en fin de traitement l'activité des CYP induite par le fipronil soit suffisamment importante pour contrebalancer les effets inhibiteurs du piperonyl butoxide. Le but de l'expérience suivante était alors à nouveau d'essayer d'inhiber la biotransformation du fipronil en fipronil sulfone en augmentant progressivement la dose de piperonyl butoxide au cours du temps et en diminuant la dose de fipronil.

E. Essai de réduction de la biotransformation du fipronil en fipronil sulfone avec des doses croissantes de piperonyl butoxide

1. Matériels et méthodes

Quatre rates ont reçu consécutivement 167, 500 puis 800 mg/kg/j de piperonyl butoxide (chaque dose étant administrée pendant 5 jours) conjointement à une dose de 1.5 mg/kg/j de fipronil administrée par gavage oro-gastrique. Les concentrations plasmatiques en fipronil et en fipronil sulfone ont été déterminées juste après la dernière administration. Les résultats attendus, si l'augmentation des doses de piperonyl butoxide permettait de contrebalancer l'augmentation d'induction des CYP par le fipronil au cours du temps, étaient une augmentation des concentrations plasmatiques en fipronil, une diminution des concentrations plasmatiques en fipronil sulfone et donc une diminution du rapport fipronil sulfone/fipronil.

2. Résultats

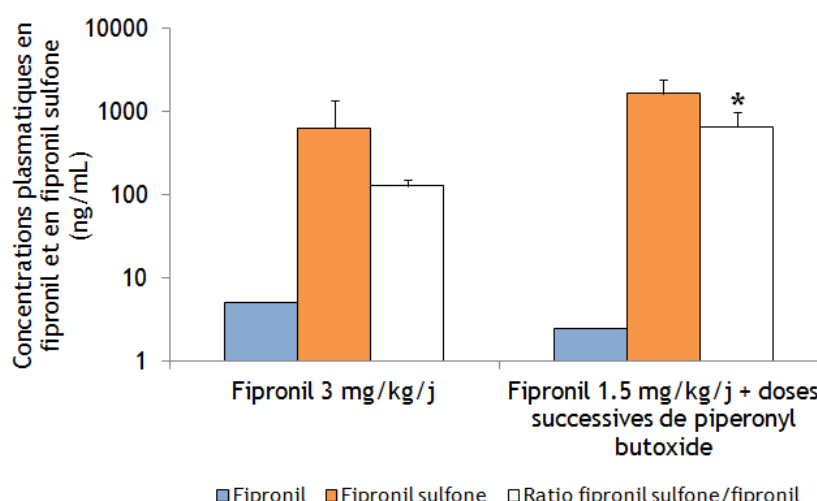


Figure 17: Concentrations plasmatiques moyennes ($\pm$ ET) en fipronil et en fipronil sulfone après administration à des rates de fipronil et de trois doses successives de piperonyl butoxide par voie orale.

Le fipronil a été administré à une dose de 1.5 mg/kg/j pendant 15 jours par voie orale à 4 rates conjointement à successivement 167, 500 et 800 mg/kg/j de piperonyl butoxide, chaque dose étant administrée 5 jours. Les concentrations plasmatiques en fipronil et en fipronil sulfone chez les rates traitées 14 jours au fipronil à 3 mg/kg/j par voie orale sont rappelées sur cette figure. Les concentrations plasmatiques en fipronil (bleu) et en fipronil sulfone (orange) ont été mesurées juste après la dernière administration de fipronil. Le rapport fipronil sulfone/fipronil est représenté par les histogrammes blancs. Significativement différent du rapport lors d'une administration de fipronil seul: * $p < 0.05$.

Lors d'administrations de piperonyl butoxide à doses croissantes conjointement au fipronil, les concentrations plasmatiques en fipronil sulfone étaient largement supérieures

à celles en fipronil à la fin de l'expérimentation avec un rapport fipronil sulfone/fipronil de 656 ± 321 (figure 17). Ce rapport était largement supérieur à celui obtenu à la fin de l'expérimentation lors d'administrations répétées de fipronil à une dose plus haute (3 mg/kg vs. 1.5 mg/kg, rapport de 127 ± 27) ou à celui obtenu lors de l'administration d'une seule dose de piperonyl butoxide conjointement à une dose plus haute de fipronil (expérimentation précédente, rapport de 140 ± 114). Etonnamment, l'administration de trois doses successives de piperonyl butoxide à 167, 500 et 800 mg/kg/j augmentait donc significativement le rapport fipronil sulfone/fipronil obtenu lors d'une administration de fipronil seul ou de fipronil avec une dose constante de piperonyl butoxide.

3. Conclusions

Nous n'avons pas été en mesure d'inhiber la biotransformation du fipronil en fipronil sulfone *in vivo* chez le rat. Au contraire, le traitement avec des doses croissantes de piperonyl butoxide semblait même favoriser la biotransformation du fipronil en fipronil sulfone. Or, le piperonyl butoxide, qui est un inhibiteur reconnu des CYP hépatiques, a également été décrit comme un potentiel activateur de ces mêmes cytochromes chez les mammifères (Butler *et al.*, 1996). Il était donc possible que nos résultats puissent s'expliquer par un rapport entre induction et inhibition des CYP par le piperonyl en faveur d'une induction lors d'un traitement sur le long terme qui potentialiserait l'induction par le fipronil de ses propres voies de métabolisation.

F. Discussion

L'objectif de ce chapitre était de déterminer les paramètres pharmacocinétiques du fipronil et du fipronil sulfone afin de mieux caractériser l'exposition au fipronil et au fipronil sulfone par voie orale chez le rat. Nous avons tout d'abord montré que lors d'administrations répétées en fipronil, tout le fipronil était rapidement transformé en fipronil sulfone, le fipronil sulfone persistant ensuite dans l'organisme, ce qui conduisait à une exposition des rats quasi exclusive au fipronil sulfone tout au long de l'expérimentation. Nous avons ensuite réalisé une étude pharmacocinétique du fipronil et du fipronil sulfone, les deux molécules étant administrées à des concentrations équimolaires par voie intraveineuse ou par voie orale. Pour la première fois, une détermination du taux de biotransformation du fipronil en fipronil sulfone par voie iv sur 120h et des biodisponibilités par voie orale du fipronil et du fipronil sulfone a été établie. D'après nos résultats et les données des évaluations réglementaires (AFSSA, 2005), l'absorption intestinale des deux molécules a été quasi-totale. De plus, la biotransformation par le foie du fipronil en fipronil sulfone a été la voie d'élimination majeure du fipronil. Un traitement des rats avec des concentrations équimolaires en fipronil et en fipronil sulfone a donc permis d'obtenir une exposition interne au fipronil sulfone similaire.

Ces résultats nous ont alors permis d'établir un schéma posologique permettant dans le chapitre suivant de déterminer si le fipronil sulfone était nécessaire et suffisant pour reproduire les effets d'un traitement au fipronil sur le métabolisme des hormones thyroïdiennes. Nous n'avons cependant pas été en mesure de bloquer la biotransformation du fipronil en fipronil sulfone *in vivo*. Nous n'avons donc pas pu établir de modèle expérimental permettant de déterminer si le fipronil, indépendamment de sa biotransformation en fipronil sulfone, pouvait être responsable des effets perturbateurs thyroïdiens chez le rat.

CHAPITRE 3: TOXICOLOGIE COMPARATIVE DU FIPRONIL ET DU FIPRONIL SULFONE *IN VIVO*

A. Problématique, hypothèses et objectifs

A ce jour, les évaluations toxicologiques réglementaires et les expérimentations réalisées précédemment dans le laboratoire ont montré qu'un traitement au fipronil a un effet perturbateur thyroïdien chez le rat via l'augmentation de la clairance de la T₄ résultant au moins en partie de l'augmentation de l'activité des UGT hépatiques (AFSSA, 2005; Leghait *et al.*, 2009). Cependant, ces études ne tiennent pas compte des différences interspécifiques en termes de métabolisme hépatique du fipronil ni du potentiel perturbateur thyroïdien des métabolites du fipronil formés *in vivo*. Or, le fipronil est rapidement métabolisé en fipronil sulfone dans plusieurs espèces comme le rat, l'Homme, les animaux de rente et le chien (AFSSA, 2005; Mohamed *et al.*, 2004). Cette voie métabolique majeure dépend des CYP dont le fipronil induit l'expression et l'activité (Das *et al.*, 2006). Chez le rat, l'effet perturbateur thyroïdien du fipronil est associé à une exposition quasi exclusive au fipronil sulfone (Leghait *et al.*, 2009); alors que chez le mouton, l'effet perturbateur thyroïdien d'un traitement au fipronil est beaucoup plus limité et associé à une plus faible exposition au fipronil sulfone (Leghait *et al.*, 2010). Le fipronil sulfone, plutôt que le fipronil lui-même, pourrait donc être responsable de la perturbation thyroïdienne engendrée par un traitement au fipronil chez le rat. Ceci est d'autant plus critique que les données obtenues chez le rat suggèrent que le fipronil sulfone persiste plus longtemps dans l'organisme que le fipronil lui-même (chapitre 2).

Le but des expérimentations de ce chapitre était de déterminer le potentiel perturbateur thyroïdien du fipronil sulfone. Pour ce faire, nous avons mis à l'épreuve l'hypothèse selon laquelle un traitement au fipronil sulfone permettait de reproduire les effets d'un traitement au fipronil chez le rat sur 1) la perturbation thyroïdienne (première expérimentation) et 2) l'activation des CYP responsables de la biotransformation du fipronil en fipronil sulfone (deuxième expérimentation), le fipronil sulfone étant décrit comme un inducteur de l'expression et de l'activité des CYP au même titre que le fipronil (Das *et al.*, 2006).

B. Comparaison des effets perturbateurs thyroïdiens d'un traitement au fipronil ou au fipronil sulfone chez le rat

1. Matériels et méthodes

a. Préparation des solutions d'hormones thyroïdiennes

Des solutions concentrées (1 mg/mL) de T₃ et de T₄ (triiodothyronine et L-thyroxine, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) ont été obtenues en diluant la T₃ ou la T₄ dans une solution de NaOH 0.4M/60% d'éthanol. La solution finale de T₃ (10 µg/mL) utilisée pour les administrations sc (10 µg/mL) a été obtenue par dilution au 1/100^e de la solution concentrée dans du sérum physiologique contenant 49.4 mg/mL de bicarbonate de sodium. La solution finale de T₄ (10 µg/mL) utilisée pour les cinétiques a été obtenue par dilution au 1/100^e de la solution concentrée dans du PBS (Phosphate Buffered Saline) 10mM, pH 7.4 contenant 0.1% (w/v) d'albumine bovine sérique.

b. Plan expérimental

Trente-neuf rates thyroïdectomisées et supplémentées en T₃ (THX + T₃) ont été utilisées pour cette expérimentation. Les animaux ont été répartis en trois groupes (n = 13 rates/groupe) traités quotidiennement avec du solvant, du fipronil (1.5 mg/kg/j ou 3.4 µmoles/kg/j) ou du fipronil sulfone (1.55 mg/kg/j ou 3.4 µmoles/kg/j) par gavage oro-gastrique pendant 14 jours. Neuf rates n'ont pas pu être utilisées dans cette étude à cause de complications durant les chirurgies ou de la perte de fonctionnalité du cathéter. Environ 24h après la dernière administration de solvant, de fipronil ou de fipronil sulfone, toutes les rates ont reçu un bolus intrapéritonéal (ip) de T₄ (10 µg/kg, respectivement n = 9, n = 10 et n = 11 pour le groupe solvant, le groupe traité au fipronil et le groupe traité au fipronil sulfone) conduisant à des concentrations plasmatiques en T₄ maximales proches des concentrations physiologiques (Leghait *et al.*, 2009). Afin de déterminer l'évolution temporelle des concentrations plasmatiques en T₄, des prélèvements sanguins ont été effectués la veille de la cinétique et 0.25, 1, 2, 4, 8, 12 et 24h après l'administration de T₄.

Les concentrations plasmatiques en fipronil et en fipronil sulfone ont été déterminées 22.5 ± 0.9h après la dernière administration de fipronil ou de fipronil sulfone. Après le dernier prélèvement de sang de la cinétique de T₄, soit 23.6 ± 0.5h après la dernière administration de T₃ et 25.7 ± 0.1h après l'administration de T₄, le sang total a été collecté via le cathéter dans des tubes héparinés en prévision de la mesure des concentrations plasmatiques en T₃. Le plasma restant après les dosages de T₄ et de T₃ par RIA a été poolé par traitement afin d'obtenir deux pools par traitement pour chaque temps de la cinétique permettant de doser les métabolites des hormones thyroïdiennes par

UPLC/MS/MS. Les foies ont été collectés afin de déterminer l'effet du fipronil et du fipronil sulfone sur l'activité hépatique des UGT1A et des SULT conjuguant les phénols, et sur l'expression des ARNm des *Ugt1a1* et des *Sult1b1*, les UGT1A1 et les SULT1B1 étant des enzymes clés pour la conjugaison de la T₄ dans le foie des rats femelles (Kester *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2005). Un schéma du plan expérimental est présenté en figure 18.

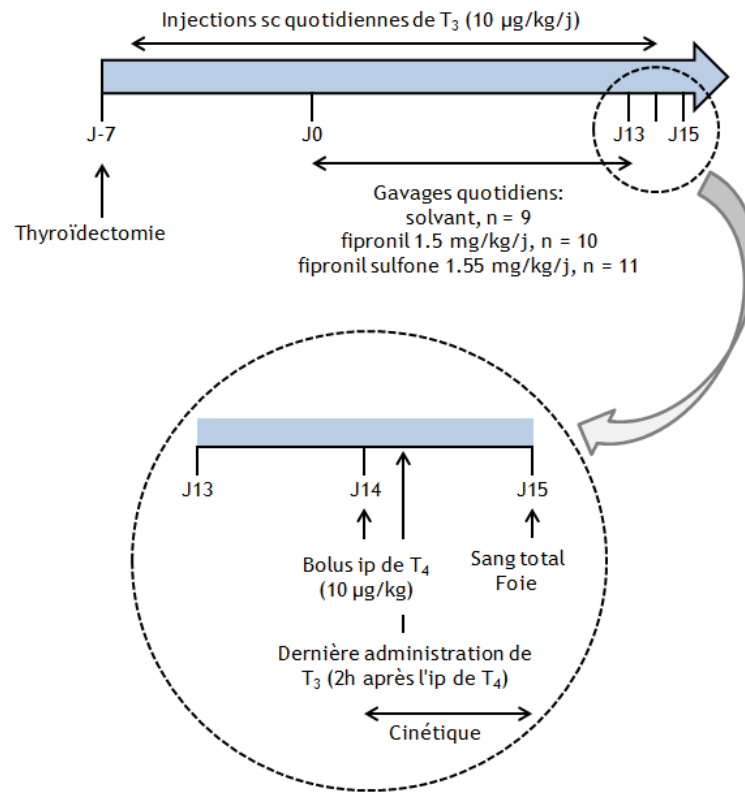


Figure 18: Schéma du plan expérimental mis en place pour déterminer l'effet du fipronil et du fipronil sulfone sur la clairance de la T₄.

Des rates ont reçu des injections quotidiennes de T₃ suite à une thyroïdectomie réalisée à J-7. Du jour 0 au jour 13, elles ont été traitées avec du solvant (n = 9), du fipronil (1.5 mg/kg/j pendant 14 jours, n = 10) ou du fipronil sulfone (1.55 mg/kg/j pendant 14 jours, n = 11). Le 14^e jour, les rates ont reçu un bolus ip de T₄ (10 µg/kg) afin de suivre l'évolution temporelle des concentrations plasmatiques en T₄ totale et en T₄ libre. Le sang total et les foies ont été collectés au moment de l'euthanasie afin de déterminer les concentrations en T₃ totale et de mesurer l'activité et l'expression des ARNm d'enzymes hépatiques.

c. Fractions subcellulaires et dosages de protéines

A partir des foies, des fractions microsomales hépatiques ont été préparées comme décrit par Zalko *et al.* (2006). Les surnageants obtenus après centrifugation des fractions S9 correspondaient aux fractions cytosoliques. La quantité de protéines dans les fractions microsomales et cytosoliques a été déterminée grâce à la méthode de Bradford (1976) en utilisant de la BSA comme standard.

d. Activité de conjugaison du 4-nitrophénol par les UGT1A

Afin de vérifier que l'augmentation de l'expression des ARNm des *Ugt1a1* se traduisait bien par une augmentation de l'activité des UGT, l'activité de conjugaison du 4-nitrophénol par les UGT1A a été mesurée. La mesure de cette activité enzymatique peut être considérée comme un biomarqueur de la capacité de glucuroconjugaison des hormones thyroïdiennes par le foie. En effet, les isoformes des UGT impliquées dans la glucuronidation de la T₄ sont les UGT1A conjuguant la bilirubine et les phénols (Visser *et al.*, 1993b). Ces enzymes conjuguent également les phénols simples comme le 4-nitrophénol (Peters *et al.*, 2003). L'activité de conjugaison du 4-nitrophénol par les UGT1A a été mesurée grâce à une optimisation de la méthode de Burchell and Weatherill (1981) à partir des fractions microsomales comme décrit par Leghait *et al.* (2009) excepté que le substrat (4-nitrophénol) était utilisé à une concentration de 4 mM.

e. Activité de sulfoconjugaison du 2-naphtol par les SULT conjuguant les phénols

Afin de vérifier que l'augmentation de l'expression des ARNm des *Sult1b1* était associée à une augmentation de l'activité des SULT, l'activité de conjugaison du 2-naphtol par les SULT conjuguant les phénols a été mesurée. La mesure de cette activité peut être considérée comme un biomarqueur de la capacité de sulfoconjugaison des hormones thyroïdiennes par le foie car le 2-naphtol comme les hormones thyroïdiennes sont conjuguées par les SULT conjuguant les phénols (Gamage *et al.*, 2006). L'activité de conjugaison du 2-naphtol par ces SULT a été mesurée grâce à une optimisation de la méthode de Sekura *et al.* (1981) modifiée par Sheng *et al.* (2001). Brièvement, le 2-naphtol (substrat, 0.25 mM) et le 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate (cofacteur, 0.2 mM) ont été mis à incuber ensemble à 37°C avec 220 µg de protéines cytosoliques diluées dans un tampon sodium acétate (0.5 M, pH 5.5). La réaction a été stoppée au bout de 10 minutes avec de l'acide sulfurique contenant du bleu de méthylène (concentration finale dans le mix respectivement de 0.1 mM et 0.15 nM). Le bleu de méthylène formait des ions appariés avec le produit de la réaction de sulfoconjugaison 2-naphtylsulfate. L'ester d'acide sulfurique résultant de la réaction a été extrait avec du chloroforme et quantifié par lecture de l'absorbance au spectrophotomètre à 651 nm. L'activité des SULT a été définie comme le nombre de nmoles de 2-naphtylsulfate formées par unité de temps et par mg de protéines cytosoliques hépatiques.

2. Résultats

a. Effet du traitement sur le poids des animaux et le poids des foies

Les poids corporels moyens ($\pm$ ET) étaient similaires pour les groupes traités au solvant, au fipronil ou au fipronil sulfone au début (236 ± 13 g, 237 ± 11 g et 240 ± 12 g) et à la fin de l'expérimentation (239 ± 20 g, 240 ± 9 g et 246 ± 10 g). Les poids moyens des foies ($\pm$ ET) exprimés en pourcentage des poids corporels étaient respectivement de $3.18 \pm 0.29\%$, $4.18 \pm 0.54\%$ et $3.83 \pm 0.55\%$ pour les groupes traités au solvant, au fipronil ou au fipronil sulfone. Les traitements au fipronil et au fipronil sulfone étaient donc associés à une augmentation significative du poids du foie respectivement de 31.5% et de 20.4% ($p < 0.01$).

b. Concentrations plasmatiques en fipronil et en fipronil sulfone

Environ 24h après la dernière administration de fipronil ou de fipronil sulfone, les concentrations plasmatiques en fipronil étaient inférieures à la LOQ du dosage. Celles en fipronil sulfone étaient respectivement de 1502 ± 394 ng/mL et de 1680 ± 557 ng/mL après une traitement au fipronil ou au fipronil sulfone. Conformément aux résultats précédents, un traitement équimolaire au fipronil ou au fipronil sulfone a donc bien conduit à des concentrations plasmatiques en fipronil sulfone du même ordre de grandeur.

c. Caractérisation de l'état pseudo-euthyroïdien

Les concentrations plasmatiques en T_3 totale ont été mesurées 23.6 $\pm$ 0.5h après la dernière administration de T_3 et 25.7 $\pm$ 0.1h après l'administration de T_4 . Les concentrations plasmatiques moyennes ($\pm$ ET) en T_3 totale étaient de 0.51 ± 0.16 ng/mL, 0.30 ± 0.07 ng/mL et 0.30 ± 0.13 ng/mL pour les groupes traités respectivement au solvant, au fipronil et au fipronil sulfone. Pour tous les groupes, les concentrations étaient de l'ordre des concentrations physiologiques en T_3 chez le rat (Döhler *et al.*, 1979). Cependant, un effet significatif du traitement ($p < 0.05$) a été observé. Les concentrations en T_3 totale étaient 1.7 fois plus faibles lors des traitements au fipronil ou au fipronil sulfone ($p < 0.05$) par rapport au groupe solvant. Il n'existait pas de différence significative entre les traitements au fipronil et au fipronil sulfone ($p > 0.05$).

d. Effet du traitement sur les paramètres pharmacocinétiques de la T_4 totale et de la T_4 libre

La T_4 était non détectable dans les échantillons de plasma collectés avant l'administration de T_4 confirmant l'absence de T_4 endogène dans ce modèle de rats pseudo-euthyroïdiens. Les concentrations maximales en T_4 totale pour le groupe solvant étaient de

l'ordre des concentrations plasmatiques en T_4 décrites chez le rat (figure 19, Topo *et al.*, 2010). Les concentrations moyennes en T_4 totale et en T_4 libre étaient plus hautes dans le groupe traité au solvant que dans les deux autres groupes pour tous les temps de prélèvement.

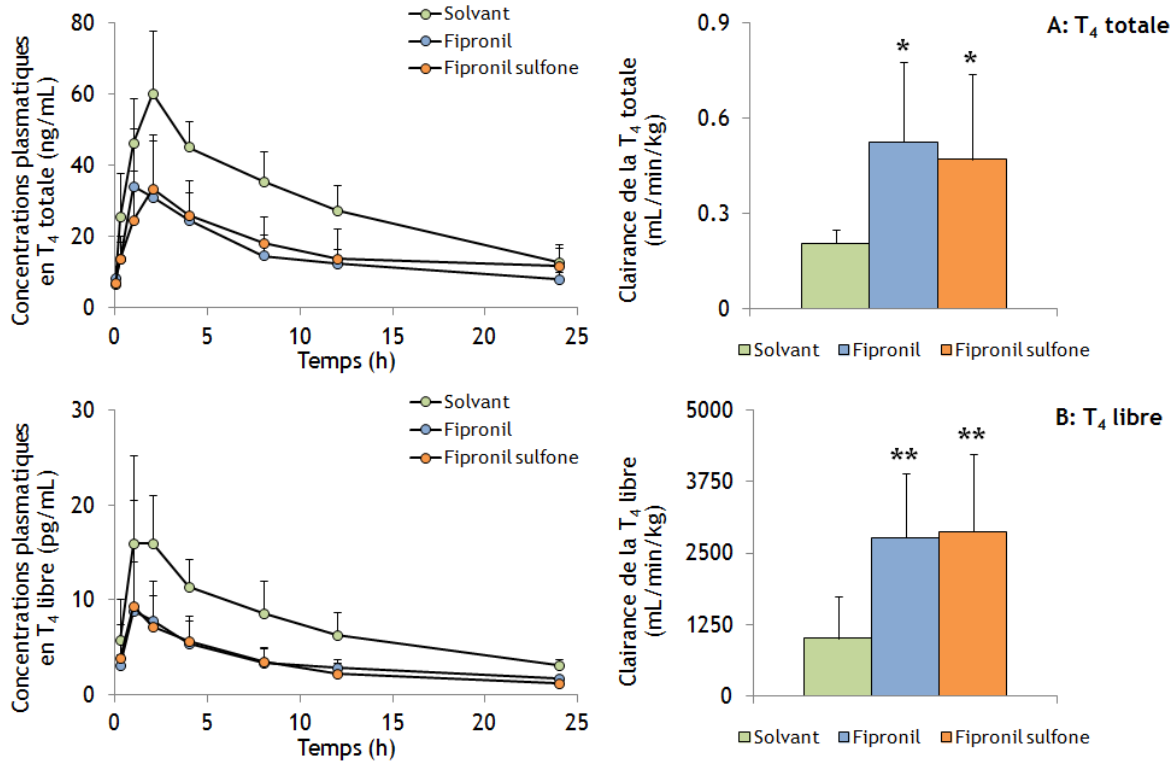


Figure 19: Effet du fipronil et du fipronil sulfone sur l'évolution des concentrations plasmatiques et la clairance de la TT4 et de la FT4 chez des rates thyroïdectomisées et supplémentées en T_3 . L'évolution des concentrations plasmatiques moyennes ($\pm$ ET) en TT4 (A, gauche) et en FT4 (B, gauche) ainsi que les clairances apparentes moyennes ($\pm$ ET) pour la TT4 (A, droite) et la FT4 (B, droite) ont été déterminées à partir des concentrations plasmatiques en TT4 et en FT4 mesurées dans des échantillons de plasma collectés la veille et 0.25, 1, 2, 4, 8, 12 et 24h après administration d'un bolus ip de T_4 (10 μ g/kg) à des rates THX + T_3 traitées pendant 14 jours avec un solvant (vert, n = 9), du fipronil (bleu, 1.5 mg/kg/j, n = 10) ou du fipronil sulfone (orange, 1.55 mg/kg/j, n = 11). Significativement différent du groupe solvant: * p <0.05, ** p <0.01.

Les clairances apparentes de la T_4 totale et de la T_4 libre étaient environ 2.5 et 2.8 fois plus élevées dans les groupes traités au fipronil et au fipronil sulfone que dans le groupe solvant. Les autres paramètres pharmacocinétiques de la T_4 totale et de la T_4 libre sont présentés dans le tableau 18. Quel que soit le paramètre pharmacocinétique estimé, il n'y avait pas de différence significative entre les groupes traités au fipronil ou au fipronil sulfone (p >0.05). En revanche, la C_{max} de la T_4 totale et de la T_4 libre et le $t_{1/2}$ de la T_4 libre étaient significativement plus faibles dans les groupes traités au fipronil ou au fipronil sulfone que dans le groupe solvant.

	Solvant (n = 9)	Fipronil (n = 10)	Fipronil sulfone (n = 11)
T₄ totale			
t _{1/2} (h)	9.5 ± 4.1	8.0 ± 5.4	8.6 ± 4.5
Tmax (h)	1.8 ± 0.5	1.6 ± 0.4	2.0 ± 1.0
Cmax (ng/mL)	56.5 ± 12.6	32.1 ± 13.8 *	32.3 ± 13.4 *
T₄ libre			
t _{1/2} (h)	8.1 ± 3.5	4.7 ± 2.0 *	4.5 ± 1.9 *
Tmax (h)	2.0 ± 0.5	1.8 ± 0.4	2.0 ± 0.9
Cmax (ng/mL)	15.5 ± 5.3	7.9 ± 2.3 *	8.7 ± 5.6 *

Tableau 18: Paramètres pharmacocinétiques moyens (± ET) de la T₄ totale et de la T₄ libre chez des rates THX + T₃ traitées avec du solvant, du fipronil ou du fipronil sulfone.

Des rates thyroïdectomisées et supplémentées en T₃ ont été traitées pendant 14 jours avec du solvant (n = 9), du fipronil (1.5 mg/kg/j, n = 10) ou du fipronil sulfone (1.55 mg/kg/j, n = 11). La T₄ totale et la T₄ libre ont été dosées dans les échantillons de plasma collectés la veille et 0.25, 1, 2, 4, 8, 12 et 24h après un bolus ip de T₄ (10 µg/kg) administrée 24h après la dernière administration de solvant, de fipronil ou de fipronil sulfone. Les paramètres pharmacocinétiques de la T₄ totale et de la T₄ libre ont été calculés à l'aide d'un modèle monocompartimental décrivant une administration extravasculaire avec des phases d'absorption et d'élimination d'ordre 1. Significativement différent du groupe solvant: *p<0.05.

e. Effet du traitement sur le profil métabolique des hormones thyroïdiennes

Les concentrations plasmatiques en rT₃ dans les pools de plasma des trois groupes traitées au solvant, au fipronil ou au fipronil sulfone étaient toujours inférieures à la LOQ du dosage. Le décours temporel des concentrations plasmatiques en T₄ obtenues dans les trois groupes était cohérent avec les valeurs des concentrations plasmatiques mesurées par RIA sur les échantillons de plasma de chaque rat pris individuellement (figure 20). Elles étaient également plus hautes pour les animaux traités au solvant que pour ceux traités au fipronil ou au fipronil sulfone pour chaque temps de la cinétique. Pour les prélèvements réalisés avant l'administration quotidienne sc de T₃, soit 0.25, 1 et 2h après l'administration ip de T₄, les concentrations plasmatiques en T₃ semblaient stables et non affectées par le traitement. En revanche, suite à l'administration de T₃, elles augmentaient rapidement jusqu'à atteindre des concentrations plasmatiques maximales respectivement de 4.31 ± 2.11, 2.36 ± 1.83 et 2.79 ± 0.86 pour les groupes traités au solvant, au fipronil et au fipronil sulfone. Ces concentrations étaient supérieures aux concentrations physiologiques. Elles diminuaient ensuite rapidement à un niveau physiologique dans les trois groupes tout en restant inférieures dans les groupes traités au fipronil et au fipronil sulfone par rapport au groupe solvant. Les concentrations plasmatiques en T₂ semblaient très stables et ne semblaient pas affectées par les administrations de T₄ ou de T₃.

Cependant, elles étaient plus élevées pour les animaux traités au solvant que pour ceux traités au fipronil ou au fipronil sulfone pour chaque temps de la cinétique.

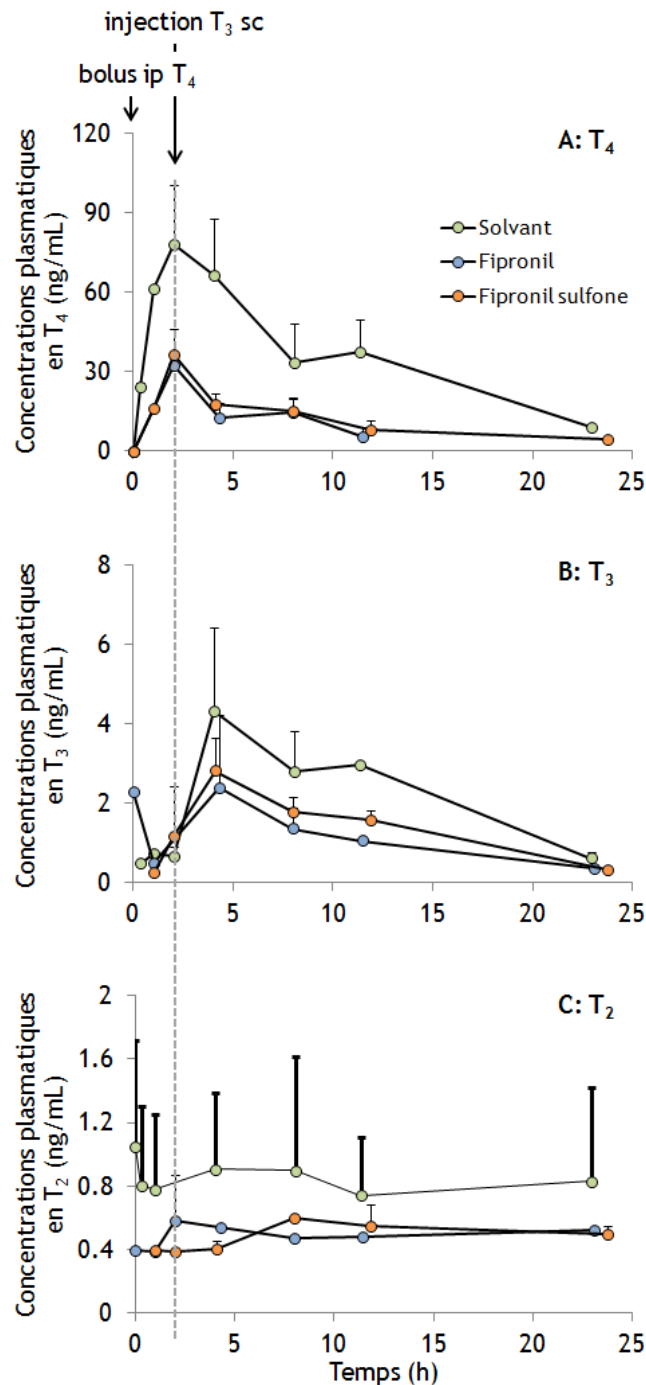


Figure 20: Evolution des concentrations plasmatiques moyennes ($\pm$ ET des deux pools) en T_4 , en T_3 et en T_2 après un bolus ip de T_4 à des rates THX + T_3 traitées avec du solvant, du fipronil ou du fipronil sulfone.

Les concentrations plasmatiques en T_4 (A), en T_3 (B) et en T_2 (C) ont été mesurées dans des échantillons de plasma collectés la veille et 0.25, 1, 2, 4, 8, 12 et 24h après l'administration de T_4 (10 $\mu\text{g/kg}$) et poolés par traitement (2 pools par traitement) chez des animaux traités pendant 14 jours avec du solvant (vert), du fipronil (bleu, 1.5 mg/kg/j) ou du fipronil sulfone (orange, 1.55 mg/kg/j).

f. Effet du traitement sur l'expression des ARNm des *Ugt1a1* et des *Sult1b1* et sur l'activité des UGT1A et des SULT conjuguant les phénols

L'expression des ARNm des *Ugt1a1* a été multipliée respectivement par 3.1 et par 4 et celle des *Sult1b1* respectivement par 2.5 et par 2.9 lors d'un traitement au fipronil ou au fipronil sulfone ($p < 0.01$, figure 21, graphiques de gauche). L'activité des UGT1A a également été multipliée respectivement par 1.9 et par 2.1 lors d'un traitement au fipronil ou au fipronil sulfone ($p < 0.01$, graphique en haut à droite). Cependant, le traitement n'a eu aucun effet sur l'activité des SULT conjuguant les phénols ($p > 0.05$, graphique en bas à droite).

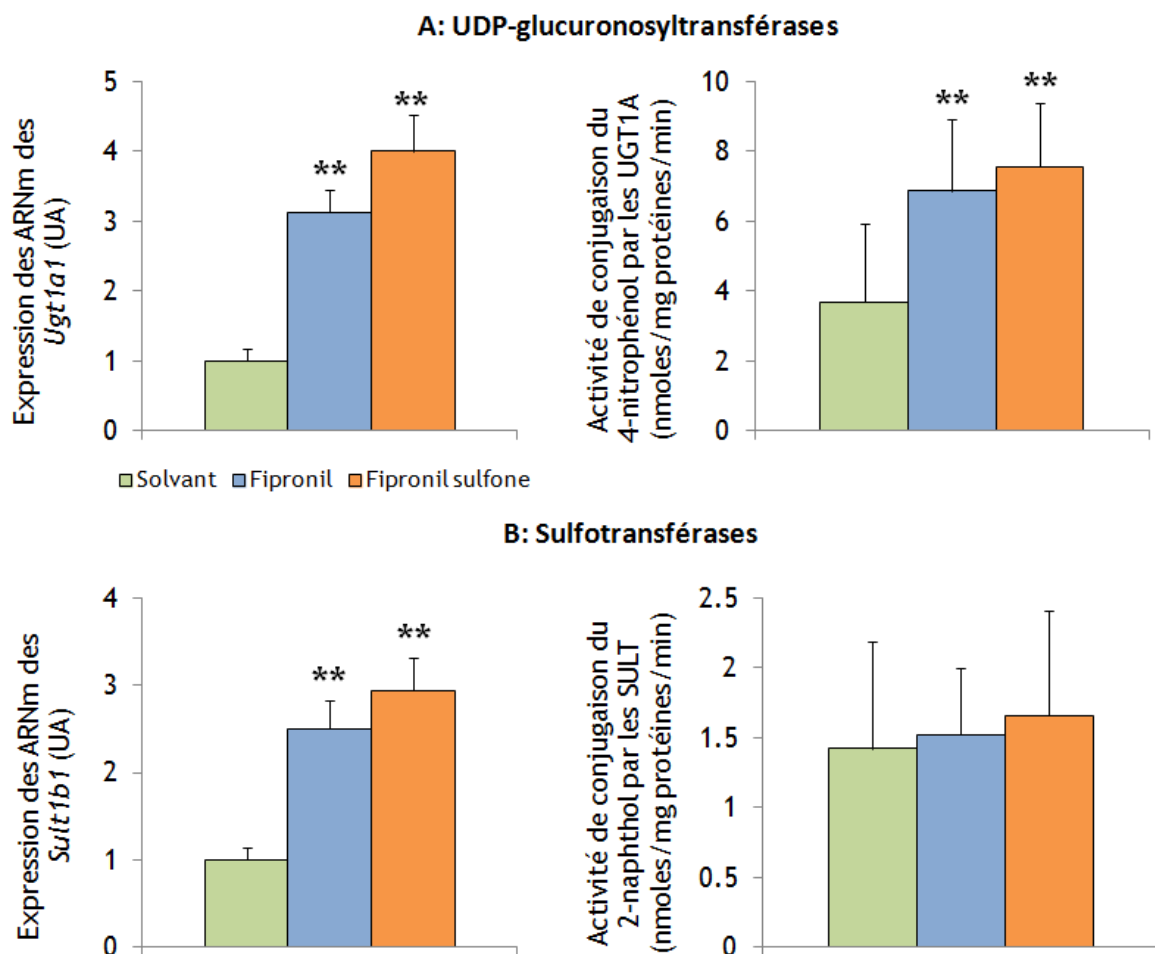


Figure 21: Effet du fipronil et du fipronil sulfone sur l'expression des ARNm et l'activité des enzymes de conjugaison de la T₄.

L'expression moyenne ($\pm$ ES) des ARNm des *Ugt1a1* (A, gauche) et des *Sult1b1* (B, gauche) et l'activité moyenne ($\pm$ ET) de glucuroconjugaison du 4-nitrophénol par les UGT1A (A, droite) et de sulfoconjugaison du 2-naphthol par les SULT conjuguant les phénols (B, droite) ont été déterminées à partir des échantillons de foie prélevés 48h après la dernière administration de solvant (vert, $n = 9$), de fipronil (bleu, 1.5 mg/kg/j, $n = 10$) ou de fipronil sulfone (orange, 1.55 mg/kg/j, $n = 11$) chez des rates THX + T₃. Significativement différent du groupe solvant: ** $p < 0.01$.

C.Comparaison des effets d'un traitement au fipronil ou au fipronil sulfone chez le rat sur l'activation des CYP

1. Matériels et méthodes

a. Préparation de la solution d'antipyrine et dosage de l'antipyrine

L'antipyrine (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) a été dissoute extemporanément dans de l'eau apyrogène stérile afin d'atteindre une concentration finale de 30 mg/mL. Les concentrations plasmatiques en antipyrine ont été déterminées par HPLC couplée à une détection UV selon la méthode décrite par Leghait *et al.* (2009). Les coefficients de variation moyens intra- et inter-jours pour trois contrôles qualité étaient respectivement de 4.3% et de 6.4%. La limite de quantification était de 0.3 µg/mL.

b. Plan expérimental

Vingt-neuf rates thyroïdectomisées et supplémentées en T₃ (THX + T₃) ont été utilisées pour cette expérimentation. Les animaux ont été répartis en trois groupes (n = 7 rates/groupe) traités quotidiennement avec du solvant, du fipronil (1.5 mg/kg/j ou 3.4 µmoles/kg/j) ou du fipronil sulfone (1.55 mg/kg/j ou 3.4 µmoles/kg/j) par gavage oro-gastrique pendant 14 jours. Six rates n'ont pas pu être utilisées dans cette étude à cause de complications durant les chirurgies ou de la perte de fonctionnalité du cathéter. Environ 24h après la dernière administration de solvant, de fipronil ou de fipronil sulfone, toutes les rates ont reçu un bolus intrapéritonéal (ip) d'antipyrine (30 mg/kg, respectivement n = 5, n = 4 et n = 6 pour le groupe solvant, le groupe traité au fipronil et le groupe traité au fipronil sulfone), afin de déterminer la clairance de l'antipyrine considérée comme un biomarqueur de la capacité oxydative du foie (Tanaka *et al.*, 1985) et plus spécifiquement de l'activité des CYP *in vivo* (Matthew and Houston, 1990). Afin de déterminer l'évolution temporelle des concentrations plasmatiques en antipyrine, des prélèvements sanguins ont été effectués la veille de la cinétique et 0.5, 1, 2, 3, 5, 7 et 9h après l'administration d'antipyrine.

Les concentrations plasmatiques en fipronil et en fipronil sulfone ont été déterminées 33.4 ± 2.0h après la dernière administration de fipronil ou de fipronil sulfone. Environ 24h après le dernier prélèvement de sang de la cinétique d'antipyrine, le sang total a été collecté via le cathéter dans des tubes héparinés. Les foies ont été collectés afin de déterminer l'effet du fipronil et du fipronil sulfone sur l'expression protéique des CYP3A, et sur l'expression des ARNm des *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, *Cyp2b2*, *Cyp3a1* et *Cyp3a2*, leurs orthologues CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6 et CYP3A4 étant responsables de la métabolisation

du fipronil (Das *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2004) et/ou de l'antipyrine (Engel *et al.*, 1996) chez l'Homme. Un schéma du plan expérimental est présenté en figure 22.

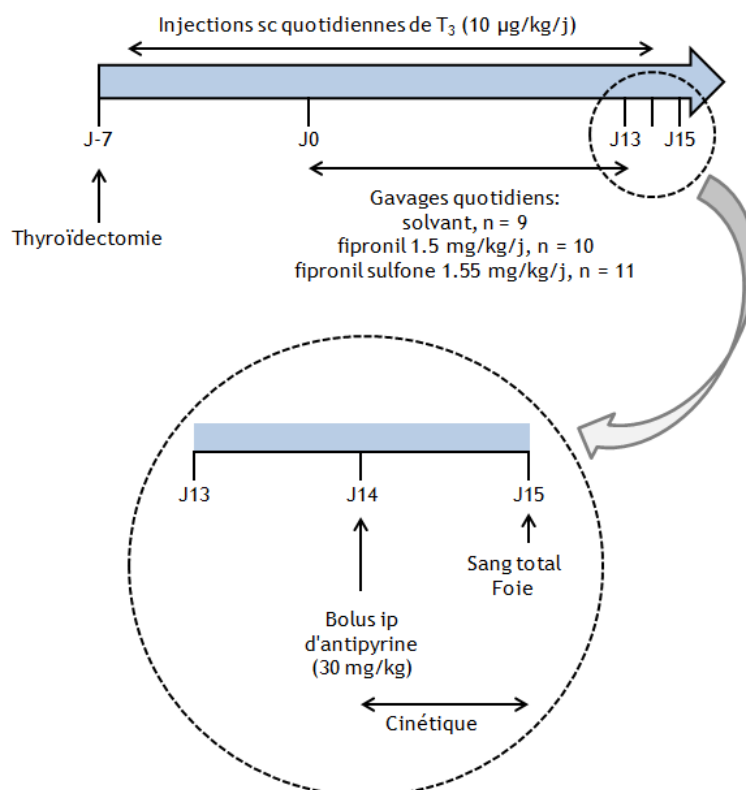


Figure 22: Schéma du plan expérimental mis en place pour déterminer l'effet du fipronil et du fipronil sulfone sur l'induction des CYP.

Des rates ont reçu des injections quotidiennes de T_3 suite à une thyroïdectomie réalisée à J-7. Du jour 0 au jour 13, elles ont été traitées avec du solvant ($n = 5$), du fipronil (1.5 mg/kg/j pendant 14 jours, $n = 4$) ou du fipronil sulfone (1.55 mg/kg/j pendant 14 jours, $n = 6$). Le 14^e jour, les rates ont reçu un bolus ip d'antipyrine (30 mg/kg) afin de suivre l'évolution temporelle des concentrations plasmatiques en antipyrine, biomarqueur de l'activité hépatique des CYP. Le sang total et les foies ont été collectés au moment de l'euthanasie afin de mesurer l'expression protéique et l'expression des ARNm d'enzymes hépatiques.

c. Fractions subcellulaires et dosages de protéines

A partir des foies, des fractions microsomales hépatiques ont été préparées comme décrit par Zalko *et al.* (2006). Les surnageants obtenus après centrifugation des fractions S9 correspondaient aux fractions cytosoliques. La quantité de protéines dans les fractions microsomales et cytosoliques a été déterminée grâce à la méthode de Bradford (1976) en utilisant de la BSA comme standard.

d. Expression protéique des CYP3A

Le CYP3A4 est la principale isoforme responsable de la S-oxydation du fipronil chez l'Homme (Tang *et al.*, 2004). Afin de vérifier chez des rates ayant reçu un bolus ip d'antipyrine (chapitre 3) que l'augmentation de l'expression des ARNm des *Cyp3a1* et

Cyp3a2, orthologues du CYP3A4 chez le rat, était associée à une augmentation de l'expression protéique du CYP3A, cette dernière a été mesurée par Western blot. Dix µg de protéines microsomales ont été dénaturées et une électrophorèse a été réalisée sur des gels précoulés (80V, 30 min, 150V, 90 min) puis les protéines ont été transférées sur une membrane PVDF (Polyvinylidène fluoride, 120V, 60 min). Après blocage du marquage non spécifique (120 min), les membranes ont été mises à incuber pendant 60 minutes avec un anticorps primaire monoclonal de souris anti-CYP3A humain (Santa Cruz Biotechnology Inc, Heidelberg, Germany). Après une série de lavages, les membranes ont été mises à incuber pendant 40 minutes avec un anticorps secondaire de chèvre anti-souris couplé à un fluorophore (IgG de chèvre anti-souris 770 CW®, Biotium, Interchim, Montluçon, France). Après une série de lavages, le signal a été quantifié par immunofluorescence infrarouge (Odyssey® infrared imaging system, Li-cor Biosciences, Les Ulis, France).

Un marqueur de poids moléculaire et trois pools de référence contenant 2, 6 ou 12 µg de protéines ont été déposés sur chaque gel en plus de 10 µg de protéines microsomales de deux animaux de chaque groupe. Une courbe de calibration de l'intensité du signal contre la quantité de protéine déposée a été obtenue en quantifiant l'intensité des signaux pour les trois pools de référence et a été utilisée pour calculer l'intensité d'un signal théorique pour 10 µg de protéines. Cette valeur a ensuite été utilisée pour normaliser l'intensité du signal entre les membranes. L'intensité relative du signal pour chaque échantillon a été définie comme le rapport de l'intensité du signal observé sur le signal théorique calculé pour 10 µg de protéines pour chaque gel et a été exprimée par gramme de tissu frais.

La spécificité de l'anticorps primaire dirigé contre les CYP3A humain pour les CYP3A de rat a été vérifiée par une préincubation de l'anticorps avec différentes quantités de supersomes de CYP3A1 ou de CYP3A2 de rat (2 à 80 µg, Supersomes™, BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France). La préincubation avec l'un ou l'autre des supersomes pendant 5h résultait en une diminution de l'immunoréactivité dans les fractions microsomales dépendante de la quantité de supersomes, confirmant ainsi la spécificité du marquage vis-à-vis du CYP3A de rat. La spécificité de l'anticorps secondaire a été déterminée en vérifiant qu'il n'y avait aucun signal supérieur au bruit de fond en absence d'anticorps primaire.

2. Résultats

a. Effet du traitement sur le poids des animaux et le poids des foies

Les poids corporels moyens ($\pm$ ET) étaient similaires pour les groupes traités au solvant, au fipronil ou au fipronil sulfone au début (237 ± 6 g, 241 ± 12 g et 243 ± 17 g) et à

la fin de l'expérimentation (243 ± 9 g, 244 ± 9 g et 244 ± 18 g). Les poids moyens des foies ($\pm$ ET) exprimés en pourcentage des poids corporels étaient respectivement de $3.41 \pm 0.35\%$, $3.89 \pm 0.40\%$ et $3.67 \pm 0.22\%$ pour les groupes traités au solvant, au fipronil ou au fipronil sulfone. Contrairement à l'expérimentation précédente, le traitement n'a eu aucun effet sur le poids relatif des foies ($p=0.11$).

b. Concentrations plasmatiques en fipronil et en fipronil sulfone

Environ 30h après la dernière administration, les concentrations en fipronil étaient inférieures à la LOQ du dosage. Celles en fipronil sulfone étaient respectivement de 1214 ± 547 ng/mL et de 1285 ± 244 ng/mL après un traitement au fipronil ou au fipronil sulfone. Conformément aux résultats précédents, un traitement équimolaire au fipronil ou au fipronil sulfone a donc bien conduit à des concentrations plasmatiques en fipronil sulfone du même ordre de grandeur.

c. Effet du traitement sur les paramètres pharmacocinétiques de l'antipyrine

Les concentrations moyennes en antipyrine étaient plus élevées dans le groupe traité au solvant que dans les deux autres groupes pour tous les temps de prélèvements (figure 23). La clairance apparente de l'antipyrine était 1.7 fois plus haute dans les groupes traités au fipronil et au fipronil sulfone que dans le groupe solvant.

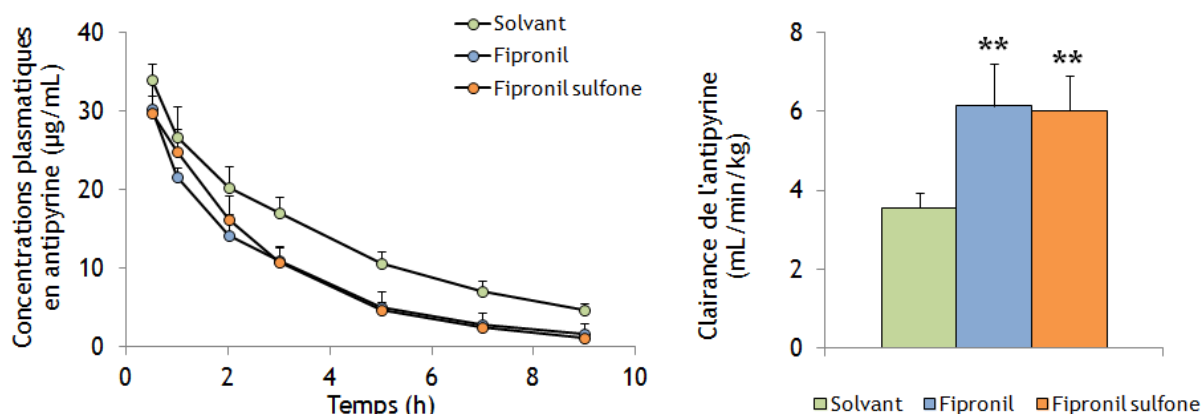


Figure 23: Effet du fipronil et du fipronil sulfone sur l'évolution des concentrations plasmatiques et la clairance de l'antipyrine chez des rates thyroïdectomisées et supplémentées en T_3 .

L'évolution des concentrations plasmatiques moyennes ($\pm$ ET) en antipyrine (gauche) ainsi que la clairance apparente moyenne ($\pm$ ET, droite) ont été déterminées à partir des concentrations plasmatiques en antipyrine mesurées dans des échantillons de plasma collectés la veille et 0.5, 1, 2, 3, 5, 7 et 9h après administration d'un bolus ip d'antipyrine (30 mg/kg) à des rates THX + T_3 traitées pendant 14 jours avec un solvant (vert, $n = 5$), du fipronil (bleu, 1.5 mg/kg/j, $n = 4$) ou du fipronil sulfone (orange, 1.55 mg/kg/j, $n = 6$). Significativement différent du groupe solvant: ** $p<0.01$.

Le temps de demi-vie d'élimination de l'antipyrine était 1.7 fois plus faible dans les groupes traités au fipronil ou au fipronil sulfone par rapport au groupe solvant ($p<0.01$,

tableau 19). Les autres paramètres pharmacocinétiques n'étaient pas affectés par le traitement.

	Solvant (n = 5)	Fipronil (n = 4)	Fipronil sulfone (n = 6)
Antipyrine			
$t_{1/2}$ (h)	2.8 ± 0.4	$1.7 \pm 0.4^{**}$	$1.6 \pm 0.2^{**}$
Tmax (h)	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.2
Cmax ($\mu\text{g/mL}$)	32.9 ± 3.9	31.4 ± 2.7	31.0 ± 3.7

Tableau 19: Paramètres pharmacocinétiques moyens ($\pm$ ET) de l'antipyrine chez des rates THX + T₃ traitées avec du solvant, du fipronil ou du fipronil sulfone.

Des rates thyroïdectomisées et supplémentées en T₃ ont été traitées pendant 14 jours avec du solvant (n = 5), du fipronil (1.5 mg/kg/j, n = 4) ou du fipronil sulfone (1.55 mg/kg/j, n = 6). Vingt-quatre heures après la dernière administration, l'antipyrine a été dosée dans les échantillons de plasma collectés la veille et 0.5, 1, 2, 3, 5, 7 et 9h après un bolus ip d'antipyrine (30 mg/kg). Les paramètres pharmacocinétiques de l'antipyrine ont été calculés à l'aide d'un modèle monocompartimental décrivant une administration extravasculaire avec des phases d'absorption et d'élimination d'ordre 1. Significativement différent du groupe solvant: **p<0.01.

d. Effet du traitement sur l'expression des ARNm des *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, *Cyp2b2*, *Cyp3a1* et *Cyp3a2* et sur l'expression protéique des CYP3A

Les traitements au fipronil et au fipronil sulfone ont entraîné une augmentation significative de l'expression des ARNm des *Cyp3a1* et *Cyp2b2* (p<0.01). L'expression des ARNm des *Cyp3a1* était 22.1 et 18.7 fois plus haute et celle des *Cyp2b2* 10.1 et 7.0 fois plus haute lors d'un traitement au fipronil et au fipronil sulfone que lors d'un traitement au solvant. Le traitement n'a eu aucun effet sur l'expression des ARNm des *Cyp1a1*, *Cyp1a2* et *Cyp3a2* (p>0.05, figure 24). Le signal d'immunoréactivité correspondant au CYP3A a été détecté à environ 52 kDa. L'expression des CYP3A a été respectivement multipliée par 4.2 et 4.5 lors d'un traitement au fipronil ou au fipronil sulfone (p<0.05, figure 25).

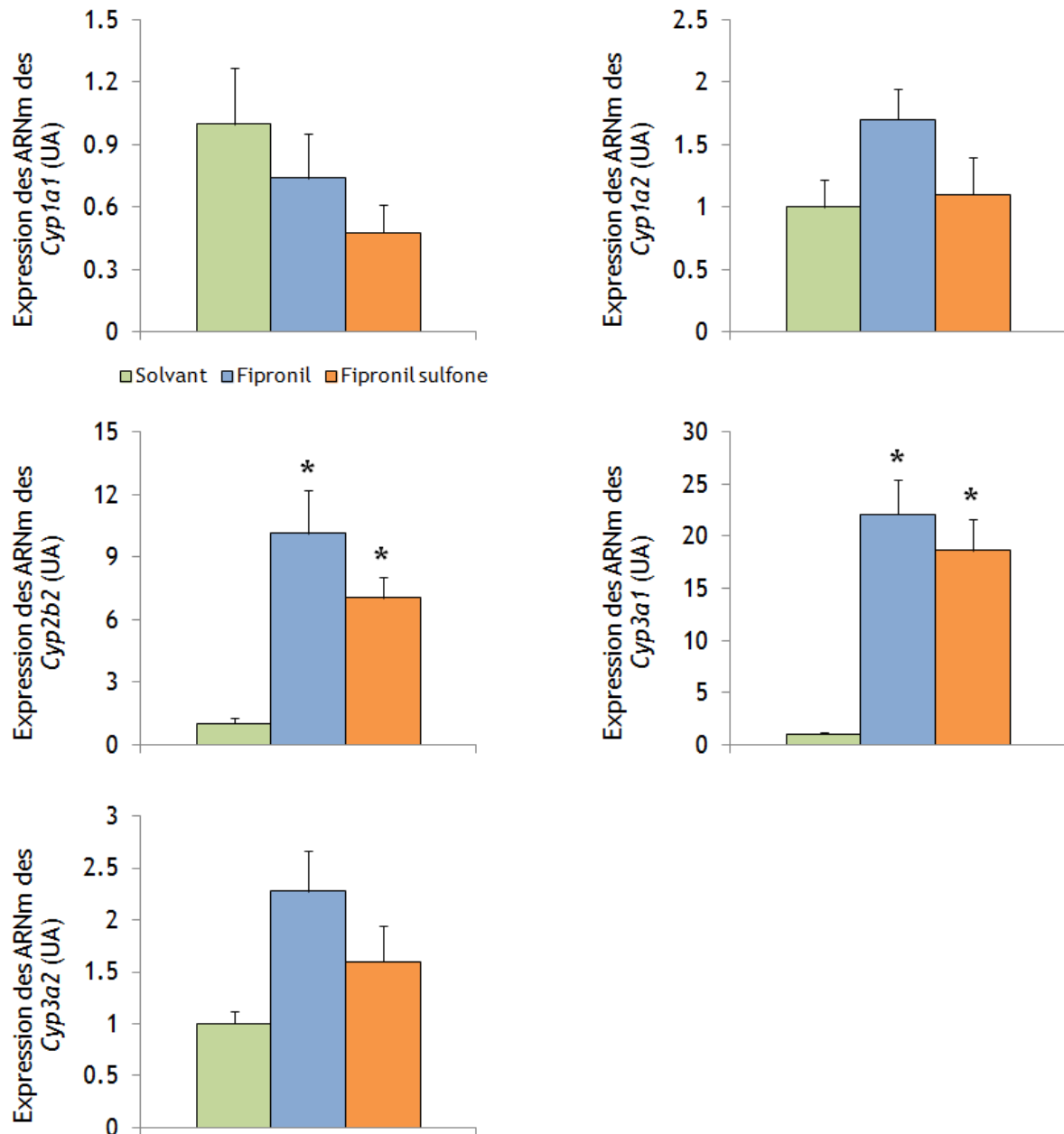


Figure 24: Effet du fipronil et du fipronil sulfone sur l'expression des ARNm des cytochromes P450 métabolisant le fipronil et/ou l'antipyrine.

L'expression moyenne ($\pm$ ES) des ARNm des *Cyp1a1* (A), *Cyp1a2* (B), *Cyp2b2* (C), *Cyp3a1* (D) et *Cyp3a2* (E) a été déterminée à partir des échantillons de foie prélevés 48h après la dernière administration de solvant (vert, n = 5), de fipronil (bleu, 1.5 mg/kg/j, n = 4) ou de fipronil sulfone (orange, 1.55 mg/kg/j, n = 6) chez des rates THX + T₃. Significativement différent du groupe solvant: *p<0.05.

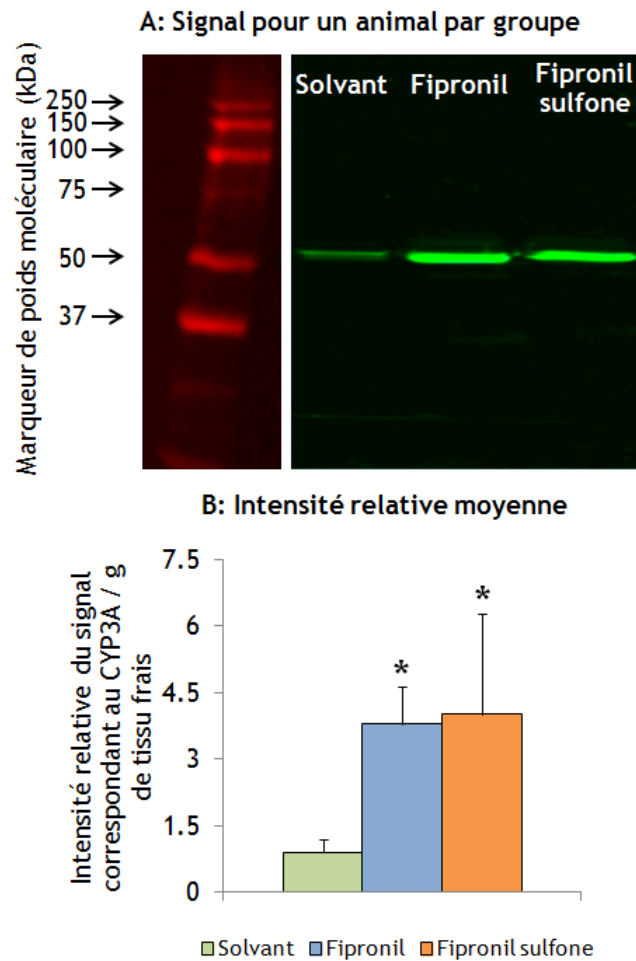


Figure 25: Signal d'immunoréactivité correspondant au CYP3A obtenu pour une rate THX + T₃ représentative traitée au solvant, au fipronil ou au fipronil sulfone (A) et intensité relative moyenne ($\pm$ ET) de ce signal pour chaque groupe (B).

L'expression protéique des CYP3A a été mesurée à partir des fractions microsomales des échantillons de foie prélevés 48h après la dernière administration de solvant (vert, n = 5), de fipronil (bleu, 1.5 mg/kg/j, n = 4) ou de fipronil sulfone (orange, 1.55 mg/kg/j, n = 6). L'intensité du signal d'immunoréactivité pour chaque échantillon a été normalisée par l'intensité du signal pour un pool de référence. Significativement différent du groupe solvant: *p<0.05.

D. Discussion

Cette étude a confirmé qu'un traitement au fipronil conduit à une augmentation des clairances de la T_4 totale et de la T_4 libre dans un modèle de rats pseudo-euthyroïdiens thyroïdectomisés et supplémentés en T_3 . Ces résultats sont en accord avec les résultats précédemment obtenus dans le laboratoire par Leghait *et al.* (2009). De plus, un traitement au fipronil sulfone permettait ici de reproduire les effets d'un traitement au fipronil sur la clairance de la T_4 , suggérant que le fipronil sulfone est un perturbateur thyroïdien chez le rat.

Les précédents résultats du laboratoire (Leghait *et al.*, 2009) montraient également que la perturbation thyroïdienne était associée à une augmentation de l'activité des UGT1A, résultat que nous avons confirmé. Dans notre étude, nous avons en outre montré que l'augmentation d'activité des UGT1A était associée à une augmentation de l'expression des ARNm des *Ugt1a1* similaire lors d'un traitement au fipronil ou d'un traitement au fipronil sulfone suggérant que les UGT1A pouvaient être impliquées dans l'augmentation de l'élimination de la T_4 .

D'autres enzymes de conjugaison semblaient impliquées dans l'augmentation de l'élimination des hormones thyroïdiennes lors d'un traitement au fipronil ou au fipronil sulfone. En effet, l'expression des ARNm des *Sult1b1* a été augmentée de la même manière par un traitement au fipronil ou par un traitement au fipronil sulfone. Cependant, aucun des deux traitements n'a eu d'effet significatif sur l'activité de conjugaison du 2-naphthol des SULT conjuguant les phénols. Cette divergence des résultats pourrait s'expliquer par le fait que la mesure de l'activité des SULT conjuguant les phénols ne permet pas de différencier l'activité de plusieurs isoformes des SULT1. En effet, les SULT1A1, SULT1A3 et SULT1C2 qui sont moins impliquées dans la sulfoconjugaison de la T_4 dans le foie des rats femelles que les SULT1B1 (Kester *et al.*, 2003) conjuguent toutes le 2-naphthol (Falany *et al.*, 2005). Il est donc tout à fait envisageable qu'une augmentation de l'activité des SULT1B1, résultant d'une augmentation de l'expression des ARNm des *Sult1b1*, ait été masquée par l'activité des autres isoformes des sulfotransférases mesurée lors du dosage.

Nos résultats sur l'expression des ARNm des *Ugt1a1* et des *Sult1b1* et sur l'activité des UGT1A montraient que les traitements au fipronil et au fipronil sulfone induisaient des augmentations comparables des voies de conjugaison de la T_4 . Ceci suggérait qu'un traitement au fipronil sulfone avait un potentiel perturbateur thyroïdien via une augmentation des voies de conjugaison de la T_4 au moins équivalent à celui d'un traitement au fipronil. Cependant, l'implication d'autres voies métaboliques de la T_4 comme la voie de désiodation des hormones thyroïdiennes ne peut pas être exclue. Afin d'avoir un meilleur aperçu des voies de désiodation potentiellement impliquées dans la perturbation

thyroïdienne engendrée par un traitement au fipronil ou au fipronil sulfone, nous nous sommes intéressés aux effets des deux traitements sur les concentrations plasmatiques en T_3 (radioimmunologie et UPLC/MS/MS) et en T_2 (UPLC/MS/MS) dans notre modèle de rats pseudo-euthyroïdiens. Dans les échantillons collectés approximativement 24h après l'administration de T_4 et 22h après celle de T_3 et dosés par radioimmunologie, les concentrations en T_3 étaient significativement plus faibles chez les animaux traités au fipronil sulfone que chez les animaux traités au solvant. De même, les concentrations plasmatiques en T_3 et en T_2 dosées par UPLC/MS/MS dans les pools de plasma étaient toujours plus faibles dans les groupes traités au fipronil ou au fipronil sulfone que dans le groupe traité au solvant. Cet effet pourrait s'expliquer par une augmentation des clairances de la T_3 et de la T_2 similaire à celle de la T_4 via une induction des voies de conjugaison de la T_3 et de la T_2 mais également par la diminution de la production de T_3 ou de T_2 par inhibition des désiodases. En effet, la conjugaison de la T_3 ou de la T_2 est une voie connue d'élimination de ces métabolites et fait appel aux mêmes systèmes enzymatiques que pour la conjugaison de la T_4 (Wu *et al.*, 2005; Curran and DeGroot, 1991). Une inhibition des désiodases régulant la production des hormones thyroïdiennes a déjà été décrite après l'incubation de microsomes de foie avec des contaminants phénoliques halogénés qui, comme le fipronil, entraînent des modifications des taux circulants en hormones thyroïdiennes (Butt *et al.*, 2011). La mesure de l'évolution temporelle des concentrations plasmatiques en T_3 aurait du permettre de dégager des pistes quant à l'implication éventuelle des désiodases. Toutefois, il a été impossible avec notre protocole expérimental de déterminer l'origine précise de la T_3 mesurée, c'est-à-dire désiodation de la T_4 ou injection de T_3 pour maintenir l'état pseudo-euthyroïdien. Nous n'avons donc pas été en mesure de démontrer qu'une autre voie de métabolisation que la voie de conjugaison ait pu être impliquée dans la perturbation induite par un traitement au fipronil ou un traitement au fipronil sulfone chez le rat. Cependant, quel que soit le paramètre étudié (profil métabolique, activité des enzymes, expression des protéines ou des ARNm), un traitement exclusif au fipronil sulfone a toujours conduit aux mêmes résultats qu'un traitement au fipronil.

Les deux traitements étaient associés à une augmentation de la clairance de l'antipyrine qui est considérée comme un biomarqueur pertinent de l'activité des CYP *in vivo* dans plusieurs espèces (Chan and Yeung, 2006; St Peter *et al.*, 1991). En accord avec les données sur le métabolisme hépatique de l'antipyrine (Engel *et al.*, 1996), cette augmentation de l'activité des CYP était associée avec une augmentation de l'expression des ARNm des *Cyp3a1* et *Cyp2b2* chez le rat. Cela concordait avec les données obtenues sur hépatocytes humains (Das *et al.*, 2006) qui montraient que le fipronil induisait les

Cyp3a4 et *Cyp2b6* humains, orthologues des *Cyp3a1* et *Cyp2b2* de rat. L'augmentation de l'expression des ARNm des *Cyp3a1* en réponse à un traitement au fipronil ou à un traitement au fipronil sulfone était associée à une augmentation de l'expression protéique des CYP3A. Le fipronil sulfone est donc capable d'induire les enzymes favorisant sa propre formation et ainsi d'accélérer sa formation à partir du fipronil lors d'une exposition chronique. La biotransformation du fipronil en fipronil sulfone pourrait donc conduire à une augmentation du risque lié à une exposition du fipronil sulfone. Bien que l'expression des ARNm des *Cyp1a1* ait été augmentée suite à un traitement au fipronil dans les hépatocytes humains (Das *et al.*, 2006), nous n'avons pas montré d'effet du fipronil ou du fipronil sulfone sur le *Cyp1a1* chez le rat. Il faut cependant noter que l'induction du *Cyp1a1* dans les hépatocytes humains avait lieu pour des concentrations en fipronil dans le milieu de culture cellulaire globalement plus hautes que les concentrations plasmatiques en fipronil et en fipronil sulfone observées dans notre étude *in vivo*. En conclusion, dans l'ensemble nos résultats montrent que le fipronil sulfone est un inducteur des CYP au moins aussi efficace que le fipronil lui-même et cible les mêmes isoenzymes, et qu'un certain nombre d'enzymes induites chez le rat *in vivo* le sont aussi chez l'Homme *in vitro*.

Une augmentation significative du poids des foies a été observée lors d'un traitement au fipronil ou au fipronil sulfone dans l'expérimentation étudiant les effets des deux traitements sur la clairance de la T₄. Cette hépatomégalie concordait avec les résultats des évaluations toxicologiques réglementaires qui ont montré une augmentation du poids des foies de rat après un traitement au fipronil (AFSSA, 2005). L'hépatomégalie et l'augmentation de l'activité des enzymes hépatiques pouvaient toutes deux être liées à une activation de récepteurs nucléaires xénosenseurs. Par exemple, l'activation des récepteurs Constitutive Androstane Receptor (CAR) et Pregnane X Receptor (PXR) est associée à une hépatomégalie (Huang *et al.*, 2005, Ross *et al.*, 2010) et à une régulation des enzymes hépatiques de phase I, en particulier les CYP2B et CYP3A, et de phase II impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques et des hormones thyroïdiennes (Konno *et al.*, 2008). Notre étude montrait clairement que plusieurs de ces voies étaient induites par le fipronil ou son métabolite. De plus, le fipronil est un ligand du PXR humain *in vitro* (Lemaire *et al.*, 2006). On peut donc supposer que les récepteurs nucléaires CAR et/ou PXR pourraient être des médiateurs de la perturbation thyroïdienne engendrée par un traitement au fipronil ou au fipronil sulfone. Cette hypothèse sera étudiée dans le chapitre 5.

En conclusion, le traitement de rats au fipronil sulfone permet de reproduire les effets d'un traitement au fipronil sur le métabolisme hépatique de la T₄ et sur l'expression et l'activité des enzymes de conjugaison et des CYP. Le métabolite serait alors au moins

aussi efficace que le fipronil pour induire une perturbation thyroïdienne. Toutefois, dans cette étude, les rats étaient traités avec des doses relativement fortes en fipronil et en fipronil sulfone. Nos conclusions ne concernent donc que l'effet maximal du fipronil et du fipronil sulfone. Seule une approche type dose-réponse permettrait de déterminer les puissances relatives (concentrations conduisant à la moitié de l'effet maximal) des deux molécules et de statuer définitivement sur leur potentiel respectif à induire une perturbation thyroïdienne. De plus, ce type d'approche devrait permettre de déterminer dans quelle fenêtre de concentrations le fipronil ou le fipronil sulfone peuvent induire une augmentation de l'élimination des hormones thyroïdiennes. On pourra ainsi savoir si le potentiel perturbateur thyroïdien du fipronil ou du fipronil sulfone peut s'exprimer pour des concentrations plasmatiques faibles, de l'ordre du ng/mL, semblables à celles retrouvées chez l'Homme dans le cadre d'une utilisation domestique ou professionnelle du fipronil (AFSSA, 2005, Herin *et al.*, 2011) et/ou d'une intoxication accidentelle à l'insecticide (Mohamed *et al.*, 2004). D'autres évaluations du rôle du métabolisme du fipronil comme facteur déterminant de son potentiel perturbateur thyroïdien semblaient donc indispensables. Un des objectifs de la suite de notre travail de thèse était d'élaborer un modèle de toxicologie comparative d'espèce *in vitro* afin de caractériser le potentiel effet perturbateur thyroïdien du fipronil et du fipronil sulfone chez l'Homme (chapitre 4) et donc la pertinence des modèles animaux. Ce point semblait d'autant plus important que la contribution potentielle du fipronil sulfone à la perturbation thyroïdienne induite par un traitement au fipronil a été jusqu'alors négligée et ce en dépit du fait que le fipronil sulfone est le principal métabolite du fipronil formé *in vivo* chez l'Homme et qu'il persiste dans l'organisme plus longtemps que le fipronil lui-même.

CHAPITRE 4: TOXICOLOGIE COMPARATIVE D'ESPECE *IN VITRO*

A. Problématique, hypothèses et objectifs

Le fipronil est un perturbateur thyroïdien chez le rat (AFSSA, 2005; Leghait *et al.*, 2009, Roques *et al.*, 2012) mais n'a qu'un effet limité chez le mouton (Leghait *et al.*, 2010). Cette perturbation thyroïdienne résulte d'une augmentation du métabolisme hépatique des hormones thyroïdiennes (Roques *et al.*, 2012). Or, le rat est un modèle controversé en ce qui concerne l'étude de ce type de perturbation thyroïdienne. En effet, il ne possède pas, contrairement à l'Homme et au mouton, de TBG, protéine plasmatique de liaison des hormones thyroïdiennes hautement spécifique supposée jouer un rôle protecteur contre la perturbation thyroïdienne. Il existe également des différences interspécifiques en termes d'enzymes hépatiques responsables de la métabolisation des hormones thyroïdiennes (Emi *et al.*, 2007; Visser *et al.*, 1998).

Nous avons montré dans le chapitre 3 que, chez le rat, la métabolisation du fipronil en fipronil sulfone pourrait être responsable du potentiel perturbateur thyroïdien d'un traitement au fipronil. Ceci est d'autant plus critique que le fipronil sulfone persiste beaucoup plus longtemps dans l'organisme que le fipronil lui-même (chapitre 2). Cependant, les expériences *in vivo* ne permettaient pas de dissocier les effets propres du fipronil de ceux de son métabolite puisque la biotransformation du fipronil en fipronil sulfone n'a pas pu être efficacement inhibée. Il est également à noter que les doses de fipronil utilisées chez le rat conduisaient à un niveau d'exposition bien supérieur à celui observé chez l'Homme lors d'une ingestion accidentelle de fipronil (Mohamed *et al.*, 2004) ou dans le cadre d'une utilisation domestique ou professionnelle (AFSSA, 2005; Herin *et al.*, 2011). Enfin, il existe des différences interspécifiques en termes d'exposition au fipronil sulfone. En effet, la forte perturbation thyroïdienne observée chez le rat lors d'un traitement au fipronil est associée à une forte exposition au fipronil sulfone, alors que le mouton est beaucoup moins exposé au métabolite.

Pour connaître le potentiel perturbateur thyroïdien du fipronil chez l'Homme, il est donc nécessaire de caractériser les différences interspécifiques de métabolisme des hormones thyroïdiennes et de biotransformation du fipronil pour déterminer quel modèle animal, entre le rat et le mouton, est le plus proche de l'Homme. Pour cela, nous avons choisi de développer un outil permettant de caractériser sur le plan quantitatif les effets du fipronil et/ou du fipronil sulfone sur le métabolisme hépatique des hormones thyroïdiennes tout en établissant une toxicologie comparative d'espèce de ces effets perturbateurs thyroïdiens. Cet outil consistait en l'établissement d'une courbe dose (fipronil, fipronil sulfone) - réponse (perturbation thyroïdienne) sur culture primaire d'hépatocytes de rat, de mouton et d'Homme.

B. Développement sur hépatocytes de rat: détermination des conditions de mise en culture pour étudier un effet perturbateur thyroïdien

Les objectifs de cette partie étaient de déterminer sur hépatocytes de rat:

1) si, comme *in vivo*, le fipronil était fortement et rapidement transformé en fipronil sulfone,

2) s'il fallait traiter les hépatocytes avec de la T_3 pour maintenir l'activité des enzymes hépatiques ou si la supplémentation du milieu de culture en T_3 pouvait être évitée,

3) si, comme *in vivo*, le fipronil et le fipronil sulfone étaient capables d'induire une augmentation de l'expression protéique des CYP3A,

4) quelle dose de T_4 et quels temps de prélèvements du milieu de culture après ajout de T_4 permettaient d'observer une diminution des concentrations extracellulaires en T_4 pendant suffisamment longtemps pour estimer une clairance de l'hormone et déterminer le potentiel perturbateur thyroïdien des différents traitements *in vitro*.

1. Matériels et méthodes

a. Préparation des solutions d'hormones thyroïdiennes

Des solutions concentrées de T_3 (2.3 mM, triiodothyronine, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) et de T_4 (2.5 mM, L-thyroxine, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) ont été obtenues en dissolvant de la T_3 ou de la T_4 dans du DMSO. Les concentrations finales de T_3 (23 nM) et de T_4 (25 nM) dans le milieu de culture ont été obtenues par dilution au 1/100e des solutions concentrées dans du DMSO (obtention de solutions à 23 μ M pour la T_3 et à 25 μ M pour la T_4) puis au 1/1000e des solutions précédentes dans le milieu de culture utilisé pour traiter les hépatocytes.

b. Préparation des solutions de fipronil et de fipronil sulfone

Des solutions concentrées de fipronil et de fipronil sulfone (20 mM) ont été obtenues en dissolvant le fipronil ou le fipronil sulfone dans du DMSO. Les concentrations finales de fipronil et de fipronil sulfone (1, 2 et 4 μ M) dans le milieu de culture ont été obtenues par dilution au 1/10e des solutions concentrées dans du DMSO (obtention de solutions à 2 mM) puis au 1/2000e (1 μ M), au 1/1000e (2 μ M) ou au 1/500e (4 μ M) des solutions précédentes dans le milieu de culture utilisé pour traiter les hépatocytes.

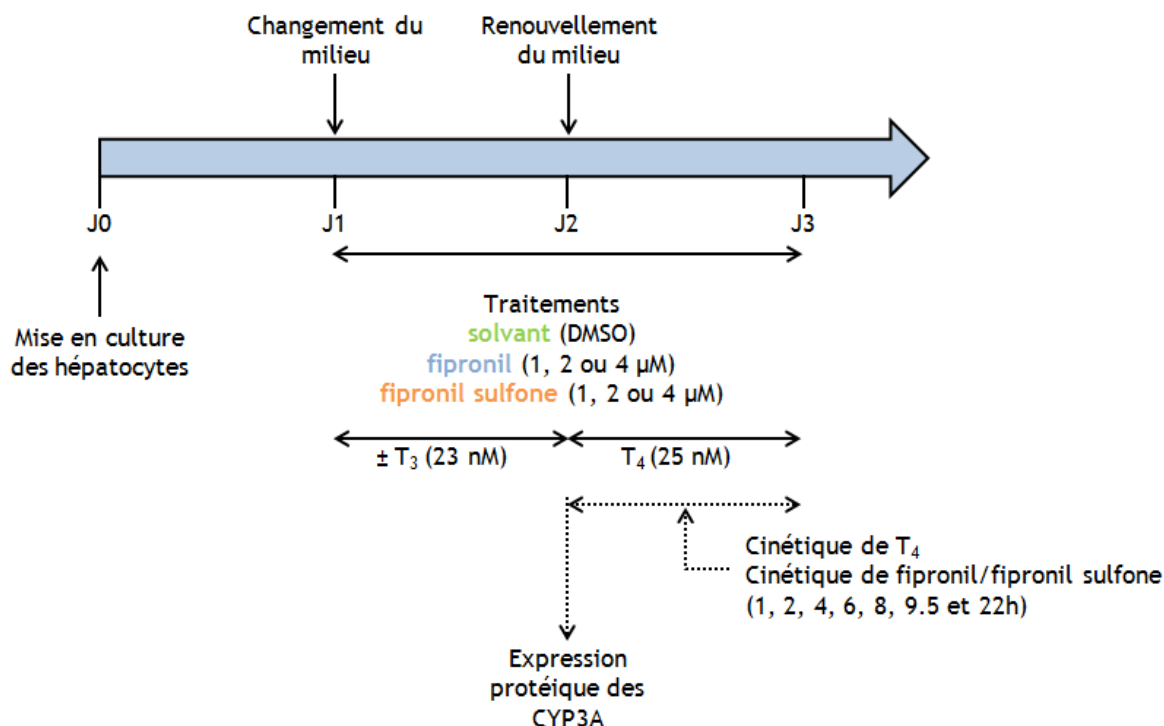
c. Plan expérimental

Figure 26: Plan expérimental mis en place afin d'établir les conditions de culture permettant d'étudier un effet perturbateur thyroïdien sur hépatocytes de rat.

Des hépatocytes de rat cryopréservés ont été mis en culture à J0 dans du milieu William's E contenant 10% de sérum de veau fœtal comme décrit dans le chapitre 1. À J1, le milieu a été remplacé par du milieu William's E sans sérum de veau fœtal et les cellules ont été incubées avec du DMSO, du fipronil à 1, 2 ou 4 µM ou du fipronil sulfone à 1, 2 ou 4 µM, et avec ou sans T₃ à 23 nM. À J2, une partie des hépatocytes a été utilisée pour mesurer l'expression protéique des CYP3A par In Cell Western. Le milieu a été renouvelé dans les plaques 96-puits contenant les hépatocytes restant et les cellules ont été incubées avec du DMSO, du fipronil à 1, 2 ou 4 µM ou du fipronil sulfone à 1, 2 ou 4 µM, et avec de la T₄ à 25 nM. Le milieu de culture a été prélevé dans ces plaques 1, 2, 4, 6, 8, 9.5 et 22h après ajout de T₄ afin de mesurer les concentrations extracellulaires en T₄ totale, fipronil et fipronil sulfone. Le pourcentage en DMSO dans le milieu de culture pour tous les traitements était de 0.5%.

d. In Cell Western

L'expression protéique du CYP3A a été déterminée pour les différents traitements par In Cell Western (Audebert *et al.*, 2010). Les hépatocytes ont été mis en culture en plaques 96-puits dans les mêmes conditions que pour l'évaluation de la clairance de la T₄ et ont été traités pendant 24h avec les différents traitements. Au bout de ces 24h, les

cellules ont été lavées avec du PBS (Phosphate Buffered Saline), fixées avec du paraformaldéhyde à 4% dans du PBS pendant 20 minutes à température ambiante, puis lavées à nouveau pendant 5 minutes avec du PBS. Le paraformaldéhyde a été neutralisé pendant 2 minutes avec du NH_4Cl et les cellules ont été lavées avec du PBS pendant 5 minutes. Les cellules ont été perméabilisées avec du Triton X-100 à 0.2% dans du PBS puis lavées avec un tampon PST (2% sérum de veau fœtal, 0.2% de Triton-X-100 dans du PBS). Les cellules ont ensuite été incubées avec un tampon de blocage (10% de sérum de veau fœtal, 2% de BSA, 0.2% de Triton dans du PBS) pendant 1h puis avec un premier anticorps primaire polyclonal de lapin anti- β -actine (Santa-Cruz Biotechnology Inc, Heidelberg, Germany) pendant 1h. Après une série de lavages avec du PST, les cellules ont été incubées avec un second anticorps primaire monoclonal de souris anti-CYP3A humain (Santa Cruz Biotechnology Inc, Heidelberg, Germany) également pendant 1h. Après une autre série de lavages, les cellules ont été incubées avec un mélange de deux anticorps secondaires de chèvre couplés à des fluorophores (IgG de chèvre anti-lapin 680 CW® et IgG de chèvre anti-souris 770 CW®, Biotium, Interchim, Montluçon, France) pendant 30 minutes. Après une dernière série de lavages avec du PST, les plaques ont été conservées à sec à +4°C jusqu'à la quantification du signal par immunofluorescence infrarouge (Odyssey® infrared imaging system, Li-cor Biosciences, Les Ulis, France).

L'intensité relative du signal pour chaque puits a été définie comme le rapport de l'intensité du signal pour le CYP3A sur l'intensité du signal pour la β -actine. La spécificité de l'anticorps primaire dirigé contre le CYP3A humain pour les CYP3A de rat avait déjà été vérifiée par Western blot. L'absence de réaction croisée entre les deux anticorps secondaires a été déterminée pour chaque plaque 96-puits de chaque espèce en omettant alternativement l'un ou l'autre des anticorps primaires. La spécificité des anticorps secondaires a été déterminée pour chaque plaque 96-puits de chaque espèce en vérifiant qu'il n'y avait aucun signal supérieur au bruit de fond en absence d'anticorps primaire.

2. Résultats

a. Biotransformation du fipronil en fipronil sulfone

Vingt-deux heures après le renouvellement des traitements en fipronil ou en fipronil sulfone à J2, soit 46h après le début d'incubation des hépatocytes avec les différents traitements, le milieu extracellulaire contenait majoritairement du fipronil sulfone. En effet, lors de l'incubation des hépatocytes avec du fipronil (figure 27, exemple représentatif pour une incubation avec du fipronil à 2 μM), les concentrations extracellulaires en fipronil diminuaient rapidement jusqu'à atteindre des concentrations extracellulaires proches de la LOQ du dosage de 0.11 μM (50 ng/mL) dès 9.5h après le

début de l'incubation. Les concentrations extracellulaires en fipronil sulfone augmentaient quant à elles suggérant une biotransformation du fipronil en fipronil sulfone presque totale de façon similaire à ce qui a été observé *in vivo* chez le rat (Leghait *et al.*, 2009; Roques *et al.*, 2012).

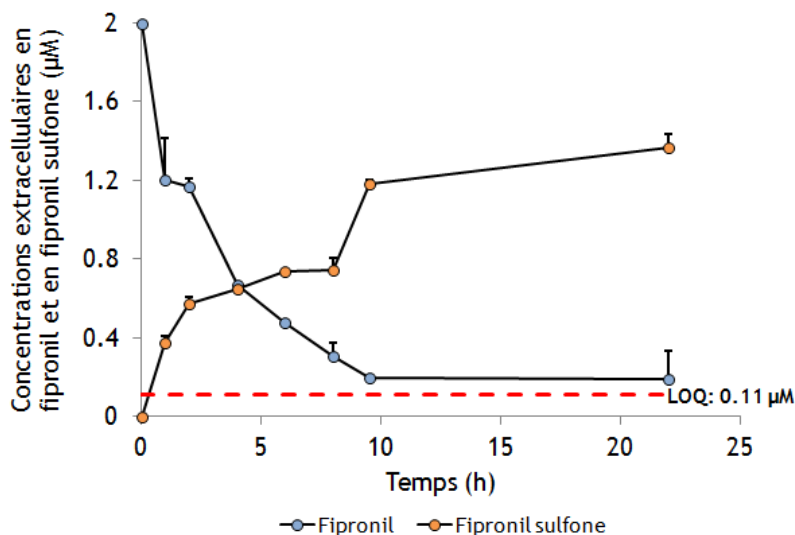


Figure 27: Evolution des concentrations extracellulaires moyennes en fipronil et en fipronil sulfone ($\pm$ ET) après incubation d'hépatocytes de rat avec du fipronil à 2 μ M.

Les hépatocytes ont été traités avec du fipronil à 2 μ M à J1 pendant 24h. Ensuite, les concentrations extracellulaires en fipronil (bleu) et en fipronil sulfone (orange) ont été mesurées dans le milieu extracellulaire collecté 1, 2, 4, 6, 8, 9.5 et 22h après le changement de milieu de culture permettant de renouveler le traitement à J2. Les valeurs indiquées au temps 0h correspondent aux concentrations en fipronil et en fipronil sulfone mesurées dans la dose administrée aux cellules à J2. Les concentrations moyennes ont été obtenues à partir des valeurs de deux puits distincts.

b. Effet de la présence ou de l'absence de T_3 sur l'expression protéique des CYP3A

L'activité des enzymes hépatiques étant dépendante de l'apport en T_3 *in vivo* (Liddle *et al.*, 1998; Masmoudi *et al.*, 1997), nous avons déterminé si l'absence de T_3 dans le milieu de culture avait un impact sur l'expression protéique des CYP3A. Pour cela, nous avons déterminé par In Cell Western l'expression protéique des CYP3A dans le groupe solvant et le groupe fipronil à 2 μ M en présence ou non de T_3 dans le milieu de culture à J2, soit 24h après le début du traitement au solvant ou au fipronil à 2 μ M. Conformément aux résultats obtenus *in vivo* (Roques *et al.*, 2012), 24h de traitement au fipronil à 2 μ M en présence de T_3 induisait une augmentation de l'expression protéique des CYP3A. La privation en T_3 du milieu de culture ne modifiait pas l'expression protéique des CYP3A basale dans le groupe solvant (DMSO) ni l'expression protéique des CYP3A induite dans le groupe fipronil à 2 μ M (figure 28).

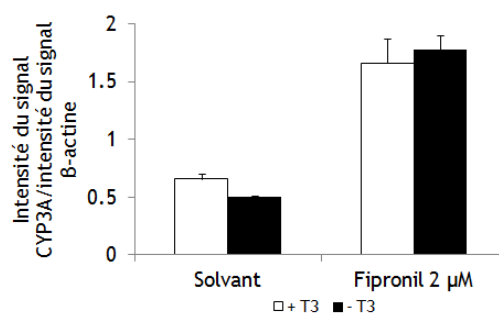


Figure 28: Effet de la présence ou de l'absence de T₃ sur l'expression protéique des CYP3A.

L'expression protéique moyenne des CYP3A ($\pm$ ET) a été déterminée comme le rapport de l'intensité du signal du CYP3A sur l'intensité du signal de la β -actine. Elle a été mesurée à J2, soit 24h après le début des traitements, à partir des valeurs de deux à quatre puits distincts par In Cell Western.

c. Effet d'un traitement au fipronil ou au fipronil sulfone sur l'expression protéique des CYP3A

L'expression protéique des CYP3A a été mesurée dans des hépatocytes ayant été incubés en présence de T₃ avec du solvant, du fipronil (1, 2 ou 4 μ M), ou du fipronil sulfone (1, 2 ou 4 μ M). Les puits correspondant au traitement avec du fipronil sulfone à 4 μ M et deux des puits correspondant au traitement avec du fipronil à 2 μ M renvoyaient un signal étonnamment faible voir inexistant (figure 29), suggérant un oubli de marquage des cellules de ces puits avec les anticorps secondaires.

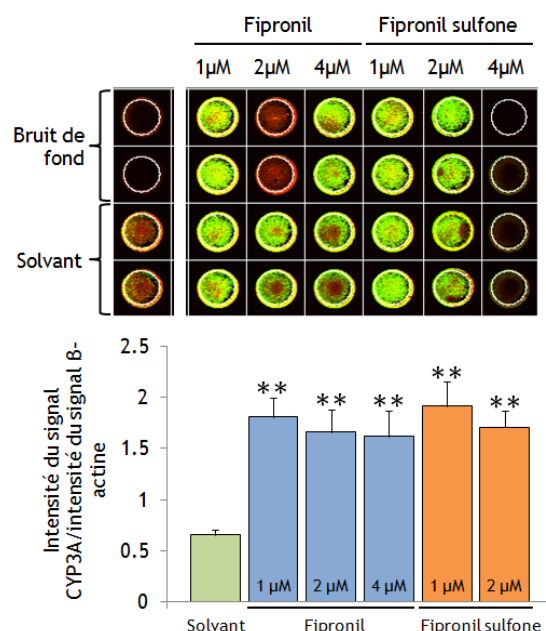


Figure 29: Effet d'un traitement au fipronil ou au fipronil sulfone sur l'expression protéique des CYP3A dans des hépatocytes de rat en présence de T₃.

L'expression protéique moyenne des CYP3A ($\pm$ ET) a été déterminée comme le rapport de l'intensité du signal du CYP3A sur l'intensité du signal de la β -actine. Elle a été mesurée à J2, soit 24h après le début des traitements au solvant (vert), au fipronil (1 à 4 μ M, bleu) et au fipronil sulfone (1 et 2 μ M, orange) à partir des valeurs de deux à quatre puits distincts par In Cell Western. Significativement différent du groupe solvant: **p<0.01.

L'expression protéique des CYP3A était significativement différente entre les hépatocytes de rat traités au solvant et ceux traités au fipronil ou au fipronil sulfone, quelle que soit la dose utilisée ($p < 0.01$). Aucun effet de la dose ou du traitement n'a été identifié pour les groupes traités au fipronil et au fipronil sulfone. Nous n'avons donc pas été en mesure d'établir un effet dose (fipronil ou fipronil sulfone) - réponse (expression des CYP3A).

d. Effet perturbateur thyroïdien d'un traitement au fipronil ou au fipronil sulfone

Les concentrations en T_4 étaient stables au cours du temps et de l'ordre des concentrations nominales dans des puits ne contenant pas d'hépatocytes. Les concentrations extracellulaires en T_4 dans les puits contenant les hépatocytes diminuaient rapidement jusqu'à atteindre des valeurs détectables mais inférieures à la LOQ du dosage de 5.28 nM (4.1 ng/mL) dès 9.5h après l'ajout de T_4 dans le milieu de culture (figure 30, exemple représentatif pour des cellules traitées au solvant, au fipronil à 2 μ M ou au fipronil sulfone à 2 μ M).

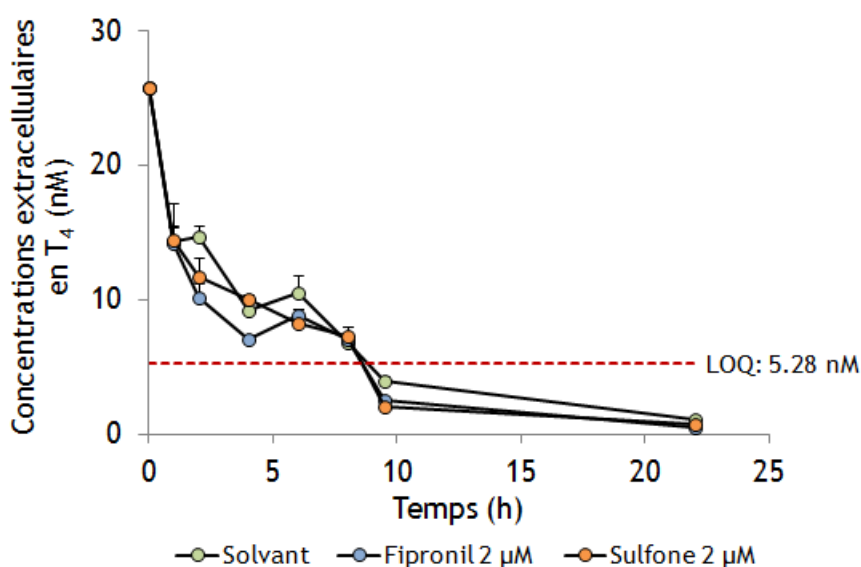


Figure 30: Evolution des concentrations extracellulaires moyennes en T_4 ($\pm$ ET) après incubation d'hépatocytes de rat avec du solvant, du fipronil à 2 μ M ou du fipronil sulfone à 2 μ M.

Les hépatocytes ont été traités avec du solvant, du fipronil à 2 μ M ou du fipronil sulfone à 2 μ M à J1 pendant 24h. Ensuite, les concentrations extracellulaires en T_4 ont été mesurées dans le milieu extracellulaire collecté 1, 2, 4, 6, 8, 9.5 et 22h après incubation avec du solvant (vert), du fipronil à 2 μ M (bleu) ou du fipronil sulfone à 2 μ M (orange) à J2. La valeur indiquée au temps 0h correspond à la concentration en T_4 théorique dans la dose administrée aux cellules à J2. Les concentrations moyennes ont été obtenues à partir des valeurs de trois puits distincts.

L'inspection visuelle des courbes suggérait que l'élimination de la T_4 suivait un processus biphasique, l'élimination étant plus rapide entre le début de la cinétique et

9.5h, puis plus lente entre 9.5h et 22h après l'ajout de T_4 dans le milieu de culture. L'ajustement des données devrait donc se faire selon un modèle bicompartimental. Cependant, compte-tenu du trop faible nombre de points pour estimer la phase terminale et de leur concentration qui n'était pas quantifiable précisément, nous n'avons pas pu déterminer une clairance de T_4 fiable pour les différents traitements.

3. Conclusions

La biotransformation du fipronil en fipronil sulfone par les hépatocytes de rat était rapide et quasi totale lors d'un traitement des hépatocytes avec du fipronil à des doses conduisant à des concentrations du même ordre de grandeur que celles retrouvées *in vivo* dans nos études (environ 1500 ng/mL soit 3.4 μ M). Ceci était cohérent avec une induction des CYP3A lors d'un traitement au fipronil. De plus, un traitement des hépatocytes de rat au fipronil sulfone permettait de reproduire l'induction des CYP3A observée lors d'un traitement au fipronil, comme c'était le cas *in vivo* (Roques *et al.*, 2012). Cependant, nous n'avons pas été en mesure d'établir une courbe dose (fipronil ou fipronil sulfone) - réponse (expression protéique des CYP3A) dans cette expérimentation, ce qui suggère que l'effet maximal des traitements était déjà atteint pour les concentrations les plus faibles (1 μ M). Nous avons donc choisi pour l'expérimentation suivante de traiter les hépatocytes avec des doses de fipronil et de fipronil sulfone plus faibles.

Pour ce qui est de l'étude de l'effet perturbateur thyroïdien des différents traitements, nous n'avons pas été en mesure d'estimer de clairance de la T_4 , les concentrations en T_4 étant trop rapidement sous la limite de quantification du dosage. Nous avons donc choisi pour l'expérimentation suivante d'augmenter la dose de T_4 tout en restant dans des concentrations de l'ordre des concentrations physiologiques chez le rat.

Enfin, pour comparer les effets perturbateurs thyroïdiens du fipronil et du fipronil sulfone, il était nécessaire d'être capable d'inhiber la biotransformation du fipronil en fipronil sulfone, ce qui n'a pas pu être fait *in vivo* chez le rat (chapitre 2). Pour cela, dans l'expérimentation suivante, nous avons à nouveau tenté d'inhiber l'activité des CYP avec du piperonyl butoxide.

C. Développement sur hépatocytes de rat: effets de l'inhibition de la biotransformation du fipronil en fipronil sulfone sur la perturbation thyroïdienne

Les objectifs de cette partie étaient de déterminer sur hépatocytes de rat:

1) si, contrairement à ce qui est observé *in vivo*, le piperonyl butoxide permettait au moins partiellement d'inhiber la biotransformation du fipronil en fipronil sulfone,

2) si une augmentation de la dose de T_4 et des temps de prélèvement du milieu de culture différents permettaient d'estimer une clairance de la T_4 pour les différents traitements et si une courbe dose (fipronil, fipronil sulfone) - réponse (clairance de la T_4) pouvait alors être établie.

1. Matériels et méthodes

a. Préparation des solutions d'hormones thyroïdiennes

Des solutions concentrées de T_3 (2.3 mM, triiodothyronine, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) et de T_4 (5 mM, L-thyroxine, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) ont été obtenues en dissolvant de la T_3 ou de la T_4 dans du DMSO. Les concentrations finales de T_3 (23 nM) et de T_4 (50 nM) dans le milieu de culture ont été obtenues par dilution au 1/100e des solutions concentrées dans du DMSO (obtention de solutions à 23 μ M pour la T_3 et à 50 μ M pour la T_4) puis au 1/1000e des solutions précédentes dans le milieu de culture utilisé pour traiter les hépatocytes.

b. Préparation des solutions de fipronil, de fipronil sulfone et de piperonyl butoxide

Des solutions concentrées de fipronil et de fipronil sulfone (5 mM) ont été obtenues en dissolvant le fipronil ou le fipronil sulfone dans du DMSO. Les concentrations finales de fipronil et de fipronil sulfone (0.05, 0.1, 0.5, 1, 2.5 et 5 μ M) dans le milieu de culture ont été obtenues par dilution sériée des solutions concentrées dans du DMSO (obtention de solutions à 500 μ M, 250 μ M, 100 μ M, 50 μ M, 10 μ M et 5 μ M) puis au 1/100e des solutions précédentes dans le milieu de culture utilisé pour traiter les hépatocytes.

Une solution concentrée de piperonyl butoxide (50 mM, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) a été obtenue en dissolvant du piperonyl butoxide dans du DMSO. La concentration finale de piperonyl butoxide (50 μ M) dans le milieu de culture a été obtenue par dilution de la solution concentrée directement dans le milieu de culture utilisé pour traiter les hépatocytes.

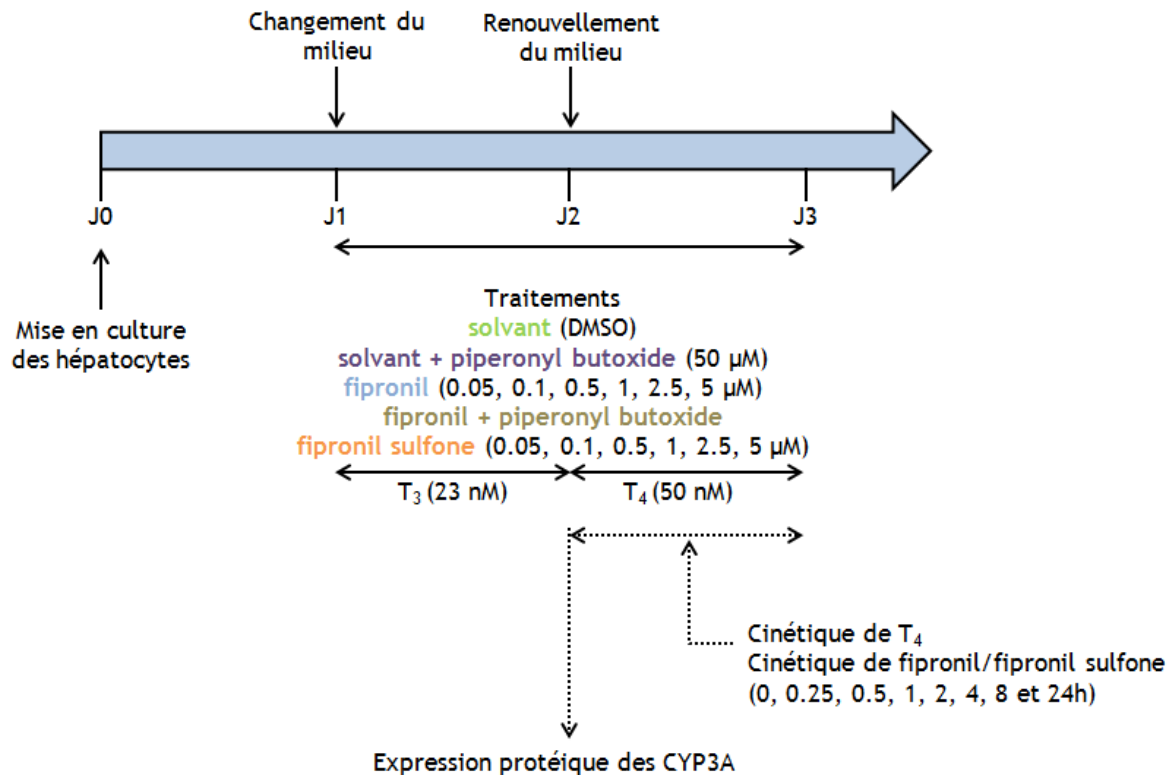
c. Plan expérimental

Figure 31: Plan expérimental mis en place pour évaluer les effets d'une inhibition de la biotransformation du fipronil en fipronil sulfone par le piperonyl butoxide.

Des hépatocytes de rat cryopréservés ont été mis en culture à J0 dans du milieu William's E contenant 10% de sérum de veau fœtal comme décrit dans le chapitre 1. À J1, le milieu a été remplacé par du milieu William's E sans sérum de veau fœtal et les cellules ont été incubées avec du DMSO, du DMSO + piperonyl butoxide à 50 µM, du fipronil à 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2.5, ou 5 µM, du fipronil à 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2.5 ou 5 µM et du piperonyl butoxide à 50 µM, ou du fipronil sulfone à 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2.5 ou 5 µM, et avec de la T₃ à 23 nM. À J2, une partie des hépatocytes a été utilisée pour mesurer l'expression protéique des CYP3A par In Cell Western. Le milieu a été renouvelé dans les plaques 96-puits contenant les hépatocytes restant et les cellules ont été incubées avec du DMSO, du DMSO + piperonyl butoxide à 50 µM, du fipronil à 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2.5, ou 5 µM, du fipronil à 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2.5 ou 5 µM et du piperonyl butoxide à 50 µM, ou du fipronil sulfone à 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2.5 ou 5 µM, et avec de la T₄ à 50 nM. Le milieu de culture a été prélevé dans ces plaques au moment du changement de milieu et 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 et 24h après ajout de T₄ afin de mesurer les concentrations extracellulaires en T₄ totale, fipronil et fipronil sulfone. Le pourcentage en DMSO dans le milieu de culture pour tous les traitements était de 1.2%.

2. Résultats

a. Biotransformation du fipronil en fipronil sulfone

Les concentrations extracellulaires en fipronil et en fipronil sulfone ont été déterminées après le changement de milieu de culture à J2, soit après les premières 24h d'incubation des hépatocytes avec du fipronil, du fipronil et du piperonyl butoxide, ou du fipronil sulfone (figure 32, exemple représentatif pour des hépatocytes traités au fipronil à 2.5 μM , au fipronil à 2.5 μM et au piperonyl butoxide à 50 μM , ou au fipronil sulfone à 2.5 μM).

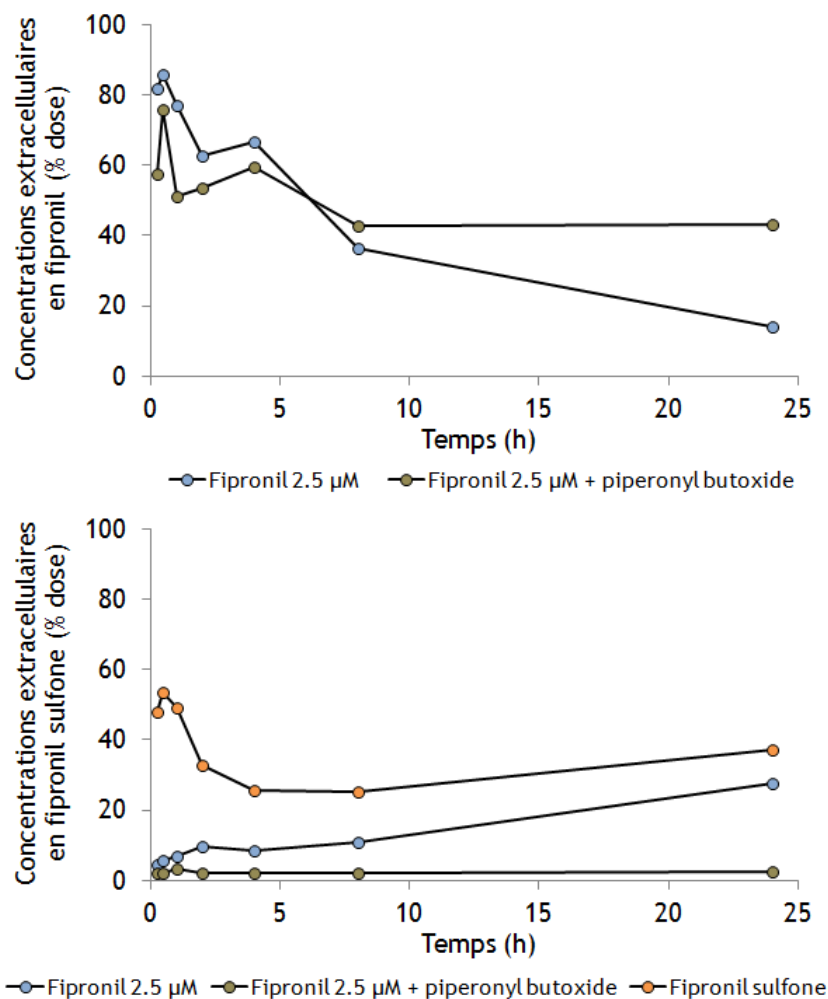


Figure 32: Evolution des concentrations extracellulaires moyennes en fipronil et en fipronil sulfone après incubation d'hépatocytes de rat avec du fipronil à 2.5 μM avec ou sans piperonyl butoxide, ou du fipronil sulfone à 2.5 μM .

Les hépatocytes ont été incubés avec les différents traitements à J1 pendant 24h. Ensuite, les concentrations extracellulaires en fipronil (graphique du haut) et en fipronil sulfone (graphique du bas) ont été mesurées dans le milieu extracellulaire collecté 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 et 24h après le changement de milieu de culture à J2. Les hépatocytes étaient traités à J1 et à J2 avec du fipronil à 2.5 μM (bleu), du fipronil à 2.5 μM et du piperonyl butoxide à 50 μM (marron) ou du fipronil sulfone à 2.5 μM (orange). Les concentrations extracellulaires ont été mesurées dans un seul puits par temps et par traitement.

Lors d'un traitement au fipronil, les concentrations extracellulaires en fipronil augmentaient entre 0.25 et 0.5h puis diminuaient jusqu'à se rapprocher de la LOQ du dosage 24h après le début du traitement. Les concentrations extracellulaires en fipronil sulfone augmentaient quand à elles progressivement jusqu'à atteindre environ 25% de la dose administrée 24h après le début du traitement au fipronil. Lors d'un traitement au fipronil sulfone, les concentrations extracellulaires en fipronil sulfone augmentaient également entre 0.25 et 0.5h puis diminuaient jusqu'à atteindre un état d'équilibre 4h après le début du traitement. Le traitement des hépatocytes au fipronil ou au fipronil sulfone permettait donc, comme *in vivo* (Roques *et al.*, 2012), d'obtenir une exposition similaire et majoritaire au fipronil sulfone après 48h de traitement.

Lors d'un traitement au fipronil et au piperonyl butoxide, la phase terminale de la cinétique d'élimination du fipronil semblait fortement atténuée par rapport à celle observée lors du traitement des hépatocytes au fipronil seul. En effet, les concentrations extracellulaires en fipronil ne diminuaient plus dès 8h après le début du traitement. La biotransformation du fipronil en fipronil sulfone semblait donc efficacement réduite par un traitement au piperonyl butoxide des hépatocytes de rat. Ceci est confirmé par des concentrations extracellulaires en fipronil sulfone plus faibles lors d'un traitement au fipronil et au piperonyl butoxide que lors d'un traitement au fipronil seul. Nous avons donc réussi à obtenir *in vitro* un modèle permettant d'exposer les hépatocytes majoritairement au fipronil et très faiblement au fipronil sulfone. Enfin, nous n'avons pas retrouvé 100% de la dose administrée aux hépatocytes dans le milieu extracellulaire, notamment lors du traitement au fipronil sulfone, suggérant la présence de fipronil et/ou de fipronil sulfone dans le milieu intracellulaire.

b. Effet perturbateur thyroïdien des différents traitements

Les concentrations extracellulaires en T_4 augmentaient entre 0.25 et 0.5h jusqu'à atteindre 70 à 90% de la dose. Cela suggérait qu'un délai était nécessaire pour équilibrer les concentrations entre le milieu extracellulaire et le milieu intracellulaire. Les concentrations extracellulaires en T_4 diminuaient ensuite pendant tout le reste de la cinétique sans atteindre des valeurs inférieures à la LOQ du dosage (figure 33, exemple représentatif pour des cellules traitées au solvant, au solvant et au piperonyl butoxide, au fipronil à 2.5 μM , au fipronil à 2.5 μM et au piperonyl butoxide, ou au fipronil sulfone à 2.5 μM).

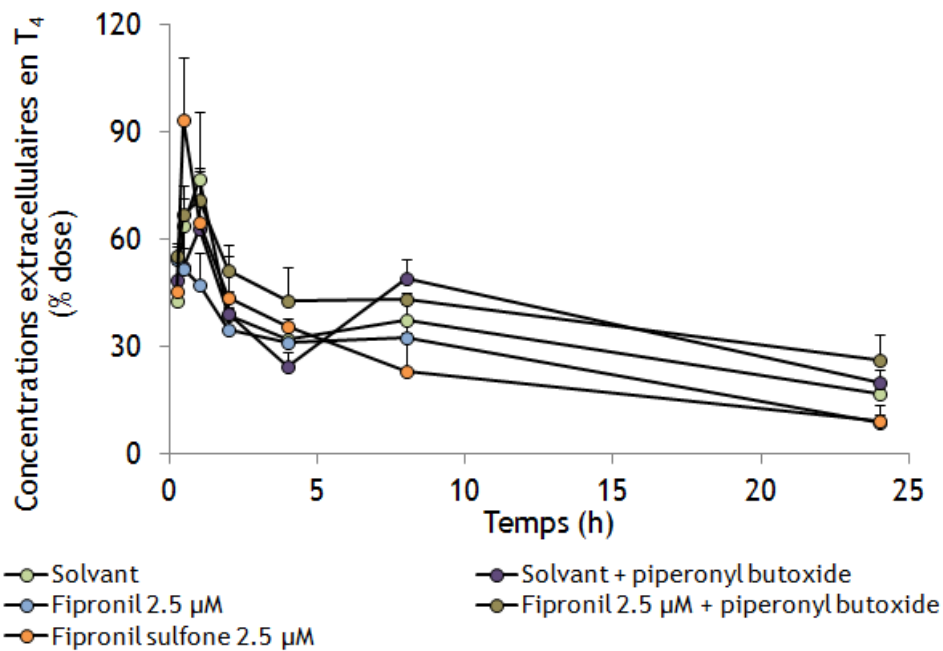


Figure 33: Evolution des concentrations extracellulaires moyennes en T_4 ($\pm$ ET) après incubation d'hépatocytes de rat avec du solvant $\pm$ piperonyl butoxide, du fipronil à 2.5 μ M $\pm$ piperonyl butoxide, ou du fipronil sulfone à 2.5 μ M.

Les hépatocytes ont été incubés avec les différents traitements à J1 pendant 24h. Ensuite, les concentrations extracellulaires en T_4 ont été mesurées dans le milieu extracellulaire collecté 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 et 24h après incubation avec du solvant (vert), du solvant et du piperonyl butoxide 50 μ M (violet), du fipronil à 2.5 μ M (bleu), du fipronil à 2.5 μ M et du piperonyl butoxide à 50 μ M (marron) ou du fipronil sulfone à 2.5 μ M (orange) à J2. Les concentrations moyennes ont été obtenues à partir des valeurs de trois puits distincts.

La clairance de la T_4 a été estimée pour chaque traitement à partir de ces données (figure 34). La clairance de la T_4 était diminuée lors du traitement des hépatocytes au solvant + piperonyl butoxide, suggérant un effet inhibiteur propre du piperonyl butoxide sur la clairance de la thyroxine. Pour comparer les effets d'un traitement au fipronil seul, d'un traitement au fipronil sulfone et d'un traitement au fipronil + piperonyl butoxide, nous avons donc choisi d'exprimer la clairance de la T_4 en pourcentage du solvant correspondant soit la clairance pour les traitements fipronil et fipronil sulfone en fonction de celle du solvant, et la clairance pour le traitement fipronil + piperonyl butoxide en fonction de celle du solvant + piperonyl butoxide. Aucune relation dose-réponse claire n'a pu être observée concernant les effets des différents traitements sur la clairance de la T_4 . L'évolution des clairances relatives en fonction de la dose administrée aux hépatocytes semblait similaire que les cellules soient traitées au fipronil, au fipronil et au piperonyl butoxide, ou au fipronil sulfone seul. En effet, quel que soit le traitement, ces clairances relatives montraient des profils fluctuants entre 0.1 et 1 μ M pour atteindre une valeur maximale à 1 μ M de l'ordre de 150 à 200% de la valeur de la clairance pour le groupe contrôle correspondant (solvant ou solvant + piperonyl butoxide). De façon surprenante à 5

μM , soit un tiers de l' IC_{50} du fipronil sulfone sur hépatocytes humains, les clairances diminuaient. A $1 \mu\text{M}$, l'effet le plus important sur la clairance relative de la T_4 a été observé avec le traitement au fipronil et piperonyl butoxide, suggérant que le fipronil est plus efficace que le fipronil sulfone pour induire le catabolisme des hormones thyroïdiennes chez le rat. Toutefois, ce résultat reste à confirmer dans de meilleures conditions de culture. En outre, l'aspect de la relation dose-réponse ne permettait en aucun cas d'établir la puissance relative des deux molécules sur la clairance de la T_4 . Les conditions expérimentales doivent donc être optimisées si l'on veut discriminer les effets propres du fipronil et de son métabolite et déterminer la puissance relative des deux molécules.

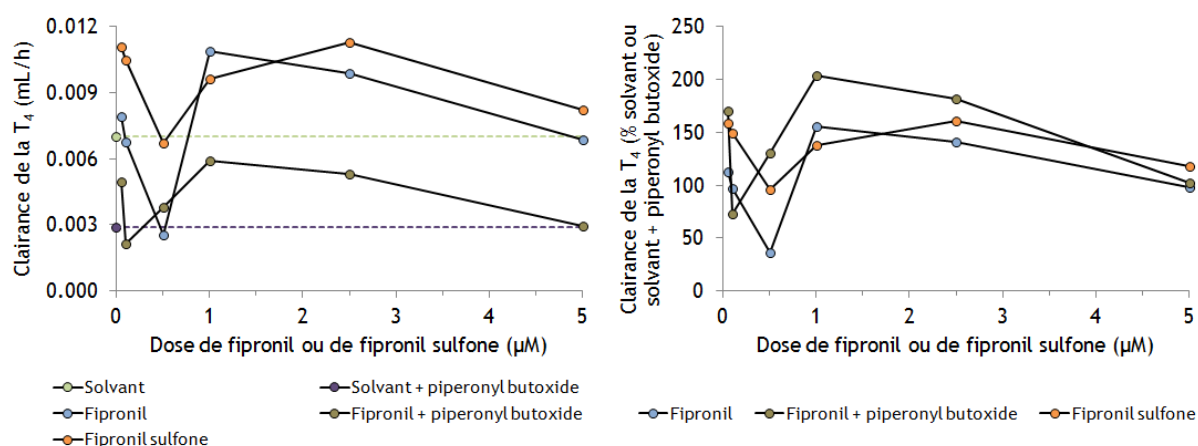


Figure 34: Clairance de la T_4 après le traitement d'hépatocytes de rat avec du solvant $\pm$ piperonyl butoxide, du fipronil $\pm$ piperonyl butoxide, ou du fipronil sulfone.

La clairance de la T_4 a été estimée à l'aide d'un modèle bicompartimental correspondant à l'administration d'un bolus iv de T_4 pour un traitement des hépatocytes de rat avec du solvant (vert), du solvant et du piperonyl butoxide $50 \mu\text{M}$ (violet), du fipronil (0.01 à $5 \mu\text{M}$, bleu), du fipronil (0.01 à $5 \mu\text{M}$) et du piperonyl butoxide $50 \mu\text{M}$ (marron) ou du fipronil sulfone (0.01 à $5 \mu\text{M}$, orange). Le graphique à gauche représente la clairance de la T_4 en fonction du traitement. Les lignes en pointillés rappellent les clairances pour le groupe solvant (vert) et le groupe solvant et piperonyl butoxide (violet). Le graphique à droite représente la clairance de la T_4 pour les différentes doses de fipronil ou de fipronil sulfone exprimée en pourcentage de celle du groupe solvant pour les hépatocytes traités au fipronil ou au fipronil sulfone, et en pourcentage de celle du groupe solvant et piperonyl butoxide pour les hépatocytes traités au fipronil et au piperonyl butoxide.

3. Conclusions

Un traitement au fipronil et au fipronil sulfone des hépatocytes de rat conduisait, comme *in vivo* (Roques *et al.*, 2012), à une exposition au fipronil sulfone similaire et majoritaire. De plus, contrairement à ce que l'on a vu *in vivo* (chapitre 2), le traitement des hépatocytes au piperonyl butoxide conjointement au traitement au fipronil permettait d'inhiber suffisamment la biotransformation du fipronil en fipronil sulfone pour exposer les hépatocytes majoritairement au fipronil. Ce modèle cellulaire permettrait donc de

déterminer l'effet propre du fipronil sur la perturbation thyroïdienne. Cependant, afin de mieux caractériser l'exposition des hépatocytes au fipronil et au fipronil sulfone, nous avons souhaité dans l'expérimentation suivante déterminer les concentrations en fipronil et en fipronil sulfone dans le milieu intracellulaire car nous n'avons pas retrouvé 100% de la dose administrée dans le milieu extracellulaire.

De plus, les concentrations extracellulaires dans le milieu de culture augmentaient entre 0.25 et 0.5h pour le fipronil et le fipronil sulfone comme pour la T_4 avant de diminuer jusqu'à la fin de la cinétique. Ceci peut être dû à un délai nécessaire pour équilibrer les concentrations entre le milieu extracellulaire et le milieu intracellulaire. Dans l'expérimentation suivante, le premier point des cinétiques ne sera alors effectué qu'1h après le début des traitements pour s'affranchir de cette phase.

Nous avons été en mesure de déterminer la clairance de la T_4 en fonction des différents traitements. Les cultures primaires d'hépatocytes semblaient donc être un modèle acceptable pour l'étude de l'effet perturbateur thyroïdien du fipronil et/ou de son métabolite. Cependant, aucun effet dose-réponse n'a été clairement observé. Ceci peut être dû à une mauvaise estimation de la clairance de la T_4 compte-tenu du faible nombre de points sur la phase terminale de la cinétique. Les temps de prélèvements du milieu de culture seront alors modifiés dans la prochaine expérimentation. Cette étude suggérait tout de même que le fipronil pouvait avoir un effet perturbateur thyroïdien propre et similaire voire supérieur à celui du fipronil sulfone. De plus, le piperonyl butoxide avait un effet inhibiteur sur la clairance de la T_4 . Ceci invalide l'approche utilisant du piperonyl butoxide et nous n'utiliserons donc pas cette inhibiteur de la biotransformation du fipronil en fipronil sulfone dans l'expérimentation suivante, mais cela soulève des perspectives intéressantes en ce qui concerne l'exploration du métabolisme des hormones thyroïdiennes.

Enfin, la mesure de l'expression des cytochromes P450 par In Cell Western effectuée dans cette expérimentation n'a pas été présentée ici du fait de la mauvaise qualité des données probablement due à de mauvaises conditions de transport des plaques entre l'INRA de Sophia-Antipolis et l'ENVT.

D. Différences interspécifiques dans la perturbation thyroïdienne induite par un traitement au fipronil ou au fipronil sulfone

Les objectifs de cette partie étaient de déterminer:

- 1) si les différentes doses en fipronil et en fipronil sulfone utilisées, conduisant à des concentrations similaires à celles observées *in vivo* chez le rat, le mouton ou l'Homme, ne présentaient pas d'effet cytotoxique,
- 2) si on pouvait reproduire *in vitro* les différences interspécifiques en termes de métabolisation du fipronil en fipronil sulfone observées chez le rat et le mouton *in vivo*, et déterminer la capacité de biotransformation du fipronil chez l'Homme,
- 3) si on observait une courbe dose (fipronil, fipronil sulfone) - réponse (clairance de la T_4) chez les trois espèces et quelles étaient les différences interspécifiques en termes de potentiel perturbateur thyroïdien d'un traitement au fipronil.

1. Matériels et méthodes

a. Préparation de la solution de thyroxine

Une solution concentrée de T_4 (5 mM, L-thyroxine, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) a été obtenue en dissolvant de la T_4 dans du DMSO. La concentration finale de T_4 (50 nM) dans le milieu de culture a été obtenue par dilution au 1/100e de la solution concentrée dans du DMSO (obtention d'une solution à 50 μ M) puis au 1/1000e de la solution précédente dans le milieu de culture utilisé pour traiter les hépatocytes.

b. Préparation des solutions de fipronil et de fipronil sulfone

Des solutions concentrées de fipronil et de fipronil sulfone (4 mM) ont été obtenues en dissolvant le fipronil ou le fipronil sulfone dans du DMSO. Les concentrations finales de fipronil et de fipronil sulfone (0.1, 0.5, 1, 2 et 4 μ M) dans le milieu de culture ont été obtenues par dilution sériée des solutions concentrées dans du DMSO (obtention de solutions à 400 μ M, 200 μ M, 100 μ M, 50 μ M et 10 μ M) puis au 1/100e des solutions précédentes dans le milieu de culture utilisé pour traiter les hépatocytes. Une concentration finale supplémentaire en fipronil (40 μ M) a été obtenue en diluant directement la solution concentrée dans le milieu de culture utilisé pour traiter les hépatocytes.

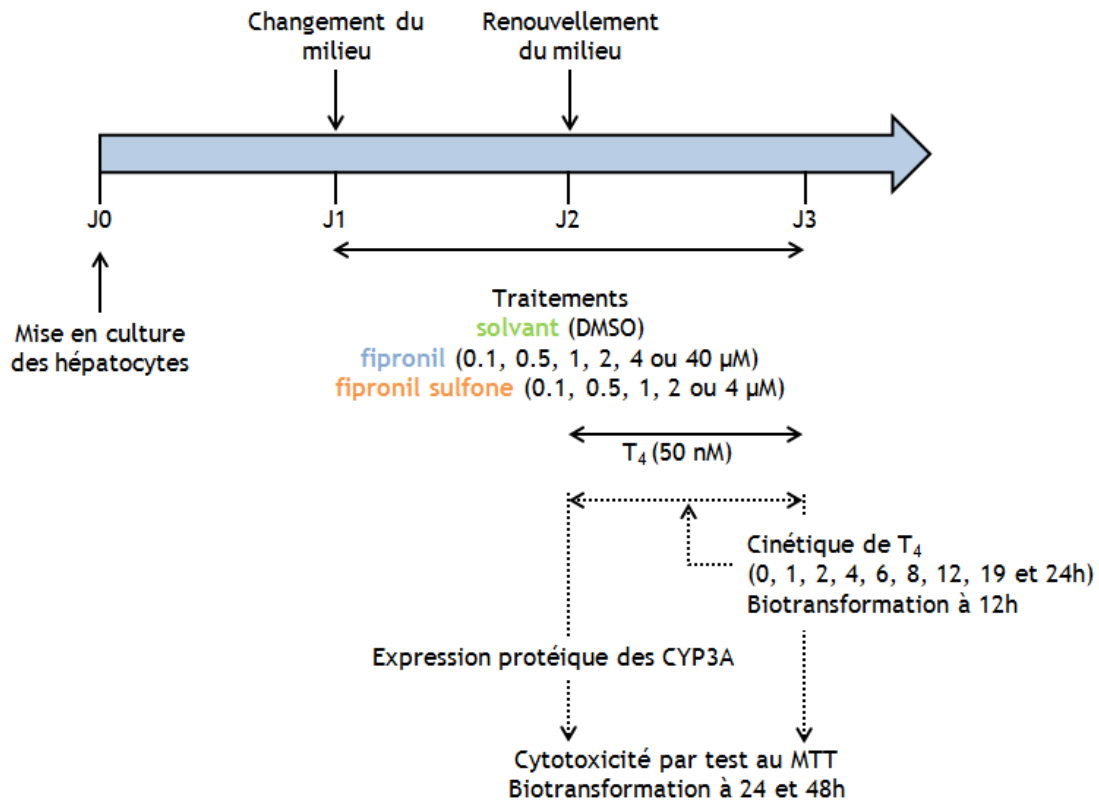
c. Plan expérimental

Figure 35: Plan expérimental mis en place pour évaluer les différences interspécifiques dans la perturbation thyroïdienne induite par un traitement au fipronil ou au fipronil sulfone.

Des hépatocytes de rat, de mouton et d'Homme ont été mis en culture à J0 dans du milieu William's E contenant 10% de sérum de veau fœtal comme décrit dans le chapitre 1. A J1, le milieu a été remplacé par du milieu William's E sans sérum de veau fœtal et les cellules ont été incubées avec du DMSO, du fipronil à 0.1, 0.5, 1, 2, 4 ou 40 μM ou du fipronil sulfone à 0.1, 0.5, 1, 2 ou 4 μM . A J2, une partie des hépatocytes de chaque espèce a été utilisée pour mesurer l'expression protéique des CYP3A par In Cell Western, les concentrations extracellulaires en fipronil et en fipronil sulfone et la cytotoxicité des traitements (test au MTT). Le milieu a été renouvelé dans les plaques 96-puits contenant une autre partie des hépatocytes de chaque espèce et les cellules ont été incubées avec du DMSO, du fipronil à 0.1, 0.5, 1, 2, 4 ou 40 μM ou du fipronil sulfone à 0.1, 0.5, 1, 2 ou 4 μM , et avec de la T_4 à 50 nM. Le milieu de culture a été prélevé dans ces plaques au moment du changement de milieu et 1, 2, 4, 6, 8, 12, 19 et 24h après ajout de T_4 afin de mesurer les concentrations extracellulaires en T_4 totale et les concentrations extracellulaires et intracellulaires en fipronil et en fipronil sulfone (prélèvement à 12h). A J3, le reste des hépatocytes de chaque espèce a été utilisé pour déterminer les concentrations extracellulaires en fipronil et en fipronil sulfone et la cytotoxicité des

traitements (test au MTT). Le pourcentage de DMSO dans le milieu de culture pour tous les traitements était de 1%.

d. Test de cytotoxicité

La viabilité des cellules au cours de l'expérimentation a été déterminée par un dosage par spectrophotométrie basé sur la capacité des cellules vivantes et non des cellules mortes à réduire le 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) pour former des cristaux de formazan de couleur bleue foncée (Mossmann, 1983). Les cellules ont été mises en culture dans une plaque 96-puits dans les mêmes conditions que pour l'évaluation de la clairance de la T₄. Le test de cytotoxicité a été effectué 24h après l'incubation avec les différents traitements à J1 et 24h après l'incubation avec les différents traitements et la T₄ à J2. Pour effectuer ce test, 10 µL de MTT ont été ajoutés aux 100 µL de milieu de culture présents dans les puits et les cellules ont été remises à incuber pendant 4h. Cent µL de tampon de solubilisation du MTT ont été ajoutés à chaque puits afin de dissoudre les cristaux de formazan. L'absorbance a ensuite été mesurée à 690 nm (longueur d'onde de référence) et à 570 nm (longueur d'onde de dosage) et la valeur d'absorbance à 690 nm a été soustraite à la valeur d'absorbance à 590 nm pour déterminer la viabilité des hépatocytes.

2. Résultats

a. Cytotoxicité des différents traitements

Pour toutes les espèces, le traitement au fipronil à 40 µM (témoin positif de cytotoxicité) était significativement plus cytotoxique que le traitement au solvant et ce dès les premières 24h de traitement, ce qui confirme le potentiel cytotoxique du fipronil dès 30 µM (figure 36). Chez le rat, seulement 12% des hépatocytes étaient viables lors du traitement au fipronil à 40 µM, et ce après 24h comme après 48h de traitement. Ce traitement semblait aussi cytotoxique chez l'Homme car respectivement 13 et 15% des hépatocytes étaient viables à 24 et 48h. Il semblait moins cytotoxique chez le mouton où respectivement 57% et 20% des hépatocytes étaient viables à 24 et 48h.

Pour toutes les espèces, les traitements au fipronil et au fipronil sulfone, quelle que soit la dose, n'étaient pas plus cytotoxiques que le traitement au solvant, et ce après 24h de traitement ou après 48h de traitement dont 24h en présence de T₄. Il n'y a eu aucun effet jour pour les hépatocytes de rat et d'Homme alors que les valeurs du test au MTT étaient significativement plus faibles à J3 qu'à J2 pour les hépatocytes de mouton ($p=0.04$). Cela pourrait être dû à un effet de la T₄ ou à un nombre de cellules plus faible dans la plaque utilisée pour le test à J3 que pour celle utilisée à J2. Enfin, les valeurs du

test au MTT pour les hépatocytes humains étaient plus faibles que celles observées pour les hépatocytes de rat ou de mouton probablement à cause d'un nombre de cellules par puits plus faible.

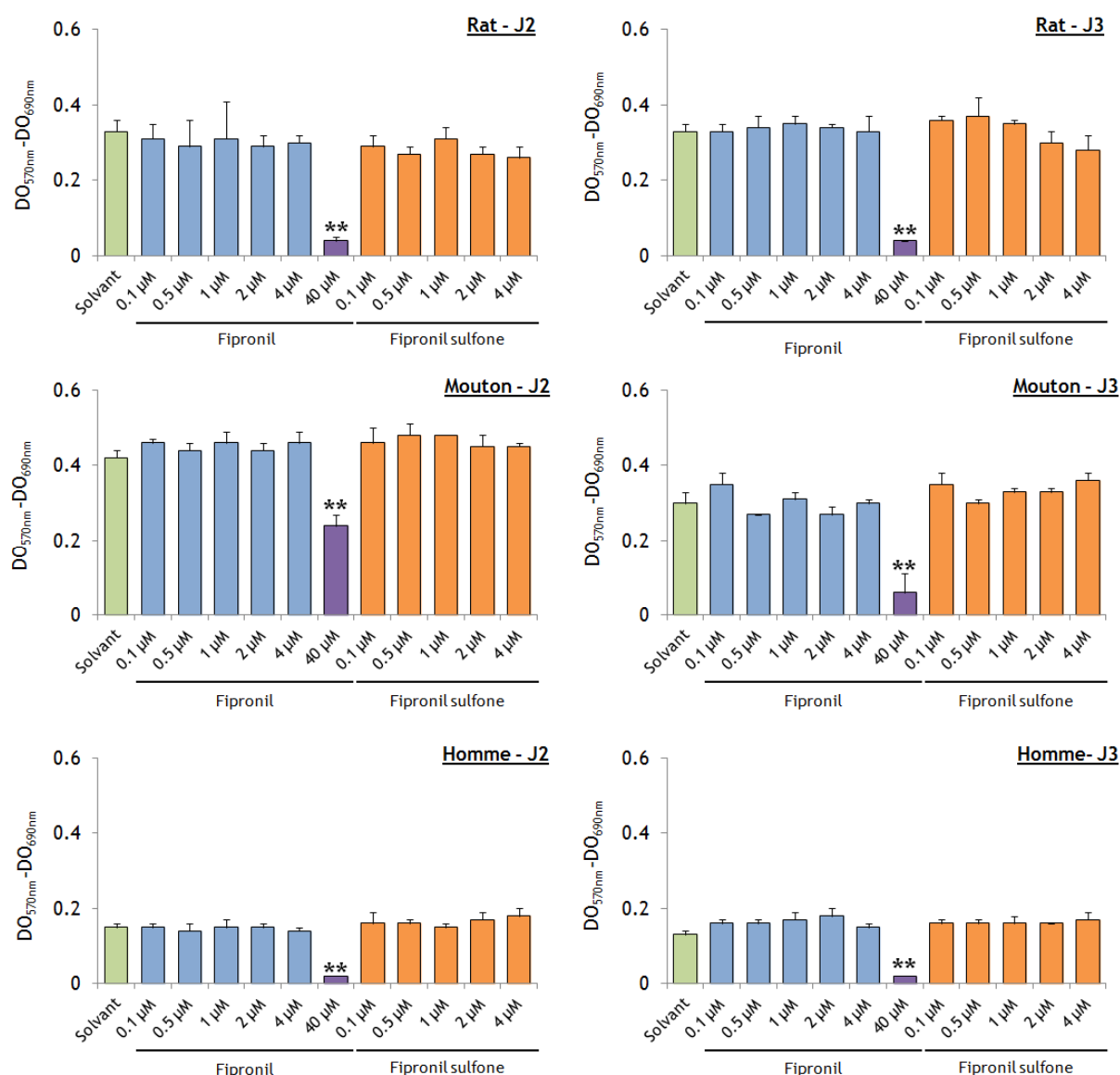


Figure 36: Effet d'un traitement au fipronil ou au fipronil sulfone sur la viabilité des hépatocytes de rat, de mouton et d'Homme.

La viabilité des hépatocytes a été déterminée à l'aide du test au MTT à J2, soit après 24h de traitement des hépatocytes, et à J3, soit 24h après le renouvellement des traitements et l'ajout de T₄. Elle a été mesurée à partir des valeurs de trois puits distincts pour chaque traitement, chaque espèce et chaque jour de test. Significativement différent du groupe solvant pour le même jour de test et la même espèce: **p<0.01.

b. Biotransformation du fipronil en fipronil sulfone

Pour toutes les espèces, et ce après 24h ou 48h de traitement, les hépatocytes n'étaient exposés qu'au fipronil sulfone lors d'un traitement au fipronil sulfone, et au fipronil et au fipronil sulfone lors d'un traitement au fipronil (figure 37).

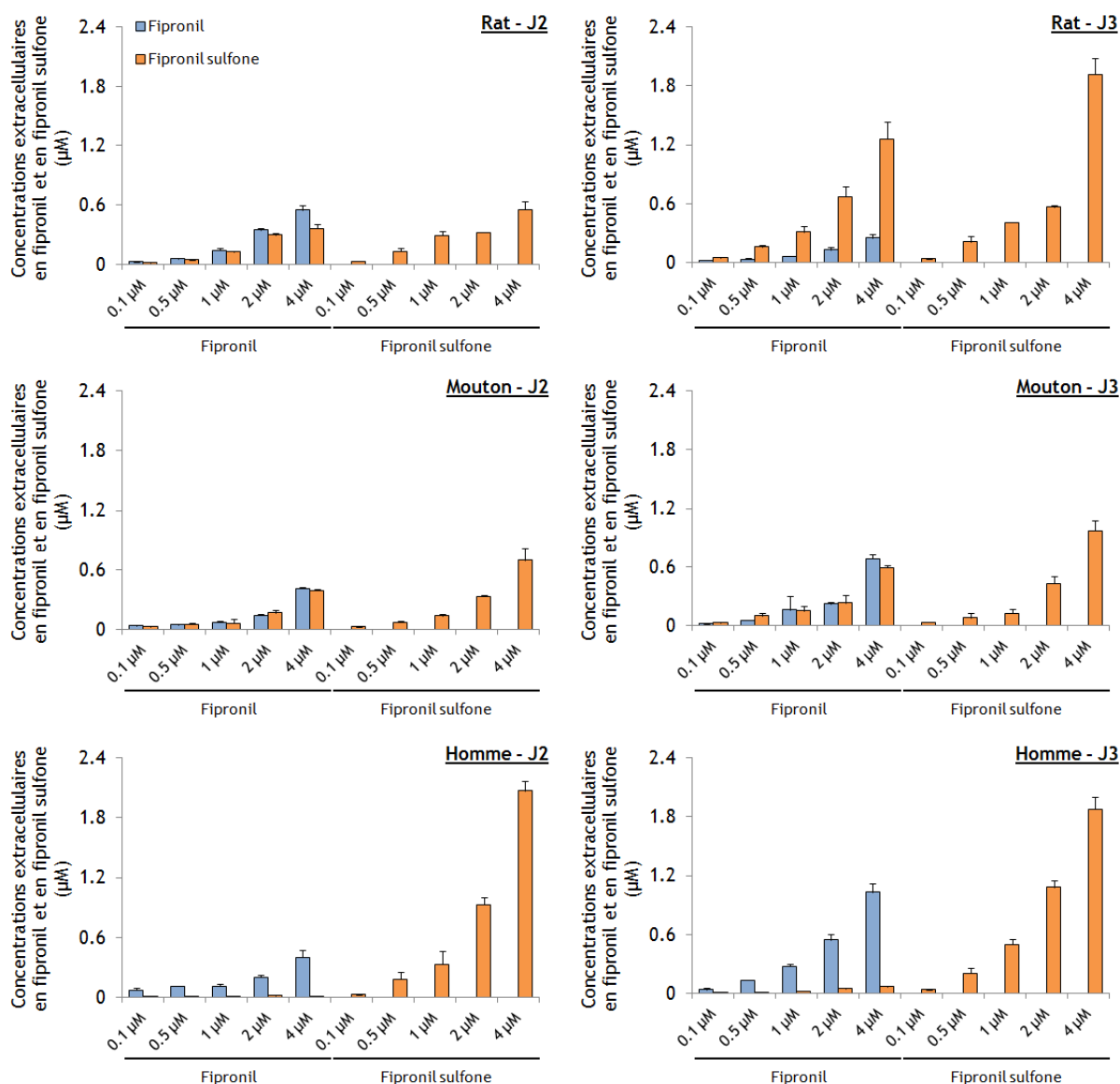


Figure 37: Evolution des concentrations extracellulaires moyennes en fipronil et en fipronil sulfone (± ET) après incubation d'hépatocytes de rat, de mouton et d'Homme avec différentes doses de fipronil ou de fipronil sulfone à J2 et à J3.

Les concentrations extracellulaires en fipronil (bleu) et en fipronil sulfone (orange) ont été mesurées dans le milieu extracellulaire collecté à J2, soit après 24h de traitement des hépatocytes, et à J3, soit 24h après le renouvellement des traitements et l'ajout de T₄. Les concentrations moyennes ont été obtenues à partir des valeurs de trois puits distincts pour chaque traitement, chaque espèce et chaque jour de traitement.

Chez le rat, les hépatocytes traités au fipronil étaient exposés au fipronil et au fipronil sulfone à des concentrations similaires après 24h de traitement, puis majoritairement au fipronil sulfone après 48h de traitement. Ceci suggérerait une augmentation du taux de biotransformation du fipronil en fipronil sulfone au cours du temps, ce qui est cohérent avec les données obtenues *in vivo* qui montraient une augmentation de la formation de fipronil sulfone au cours du temps associée à une induction des CYP3A par le fipronil mais aussi par son métabolite (Roques *et al.*, 2012).

Chez le mouton, après 24h comme après 48h de traitement au fipronil, les hépatocytes étaient exposés à des concentrations similaires en fipronil et en fipronil sulfone. On retrouve donc bien les différences interspécifiques en termes de métabolisation du fipronil en fipronil sulfone observées *in vivo* chez le rat et le mouton (Leghait *et al.*, 2009; Leghait *et al.*, 2010). Chez l'Homme, les hépatocytes traités au fipronil étaient majoritairement exposés au fipronil et très peu au fipronil sulfone. Compte tenu du test au MTT qui suggérait que le nombre de cellule par puits était très faible pour cette espèce et compte tenu des résultats de l'In Cell Western qui montraient que l'expression des CYP3A était très difficilement quantifiable (données non présentées), il semblait probable que ce défaut de métabolisation du fipronil en fipronil sulfone n'ait pas été lié à une particularité d'espèce mais plutôt à de mauvaises conditions de mise en culture des hépatocytes humains.

Pour compléter ces données, nous avons déterminé les concentrations intracellulaires en fipronil et en fipronil sulfone car nous ne retrouvons pas 100% de la dose administrée dans le milieu extracellulaire à 24 comme à 48h de traitement. Ces concentrations intracellulaires ont été déterminées après 36h de traitement et comparées avec les concentrations extracellulaires mesurées au même temps (figure 38).

Pour les hépatocytes humains, le fipronil lors d'un traitement au fipronil et le fipronil sulfone lors d'un traitement au fipronil sulfone étaient essentiellement retrouvés dans le milieu extracellulaire. La capacité de capture du fipronil et du fipronil sulfone à l'intérieur des cellules était donc faible chez l'Homme, ce qui expliquait le faible taux de métabolisation du fipronil en fipronil sulfone par les cytochromes P450 intracellulaires. Cependant, nous n'étions pas en mesure de déterminer si cette faible pénétration du fipronil et du fipronil sulfone dans les hépatocytes humains était liée à une particularité d'espèce ou à de mauvaises conditions de mise en culture des hépatocytes. Pour les hépatocytes de rat et de mouton, les concentrations en fipronil ou en fipronil sulfone après un traitement au fipronil ou au fipronil sulfone sont globalement en équilibre entre le milieu intracellulaire et le milieu extracellulaire. Lors d'un traitement au fipronil à la même dose, les concentrations intracellulaires en fipronil et en fipronil sulfone semblaient plus hautes chez le rat que chez le mouton (respectivement pour le rat et le mouton $0.75 \pm 0.02 \mu\text{M}$ et $0.52 \pm 0.03 \mu\text{M}$ pour le fipronil et, $0.73 \pm 0.03 \mu\text{M}$ et $0.39 \pm 0.12 \mu\text{M}$ pour le fipronil sulfone, pour une incubation avec du fipronil à $4 \mu\text{M}$). Il se pourrait donc que la différence interspécifique de métabolisation du fipronil en fipronil sulfone entre le rat et le mouton dépende d'une différence de capacité des CYP à métaboliser le fipronil mais aussi d'une différence de capacité de capture du fipronil dans les cellules.

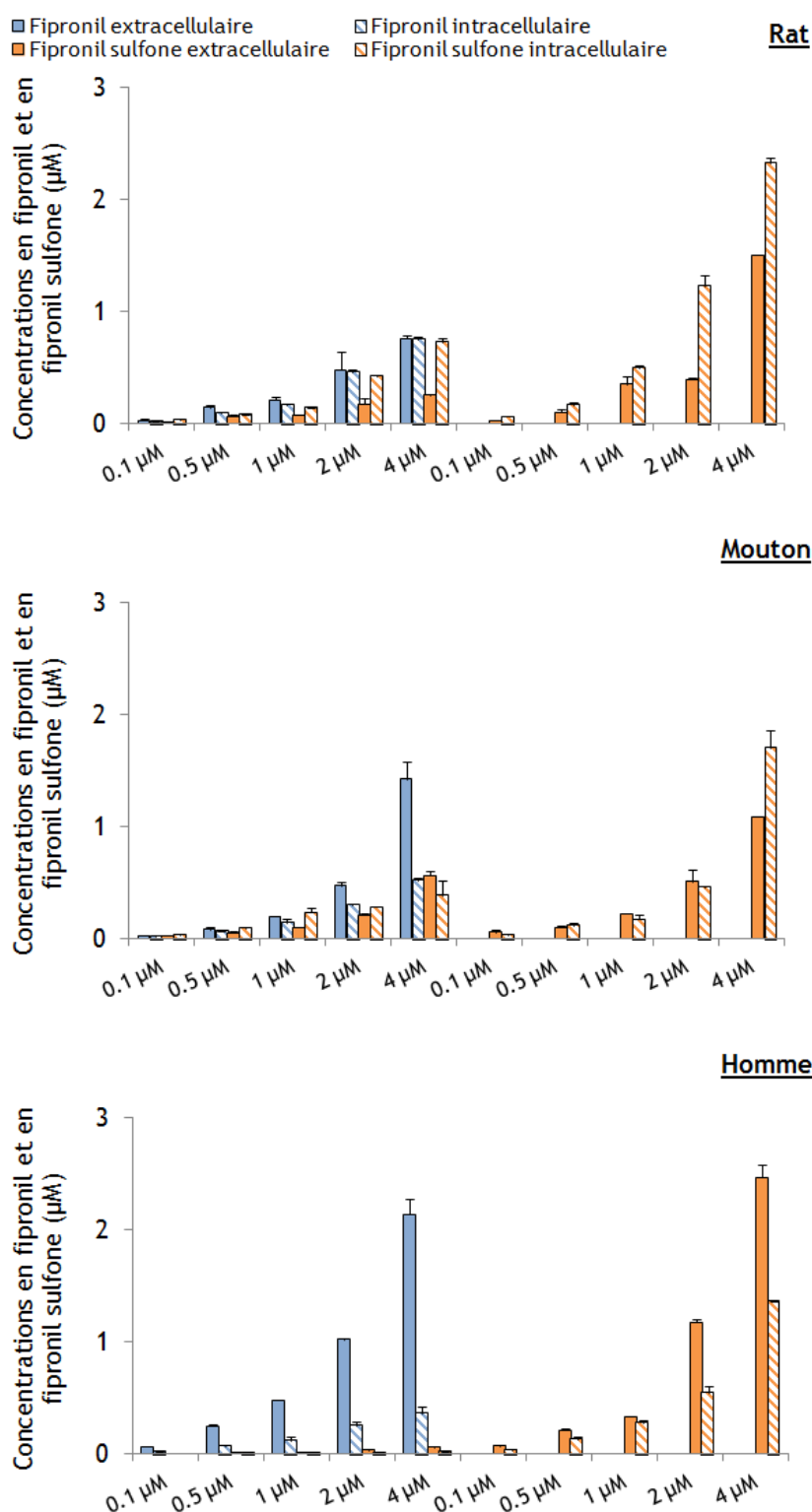


Figure 38: Evolution des concentrations extracellulaires et intracellulaires moyennes en fipronil et en fipronil sulfone ($\pm$ ET) après incubation d'hépatocytes de rat, de mouton et d'Homme avec différentes doses de fipronil ou de fipronil sulfone.

Les concentrations extracellulaires et intracellulaires en fipronil (bleu) et en fipronil sulfone (orange) ont été mesurées dans le milieu extracellulaire collecté au temps 12h de la cinétique de T_4 , soit 12h après le renouvellement des traitements et l'ajout de T_4 . Les concentrations moyennes ont été obtenues à partir des valeurs de trois puits distincts pour chaque traitement et chaque espèce.

c. Effet perturbateur thyroïdien d'un traitement au fipronil ou au fipronil sulfone chez les différentes espèces

Les concentrations extracellulaires en T_4 étaient assez stables au cours du temps pour les hépatocytes humains, suggérant que la capacité de métabolisation de la T_4 de ces hépatocytes était anormalement réduite et/ou que la durée de la cinétique n'était pas suffisante pour observer la phase de décroissance de la T_4 dans le milieu extracellulaire (figure 39, exemple représentatif pour des hépatocytes de rat, de mouton et d'Homme traités au solvant, au fipronil à 0.1 ou 4 μM , ou au fipronil sulfone à 0.1 ou 4 μM).

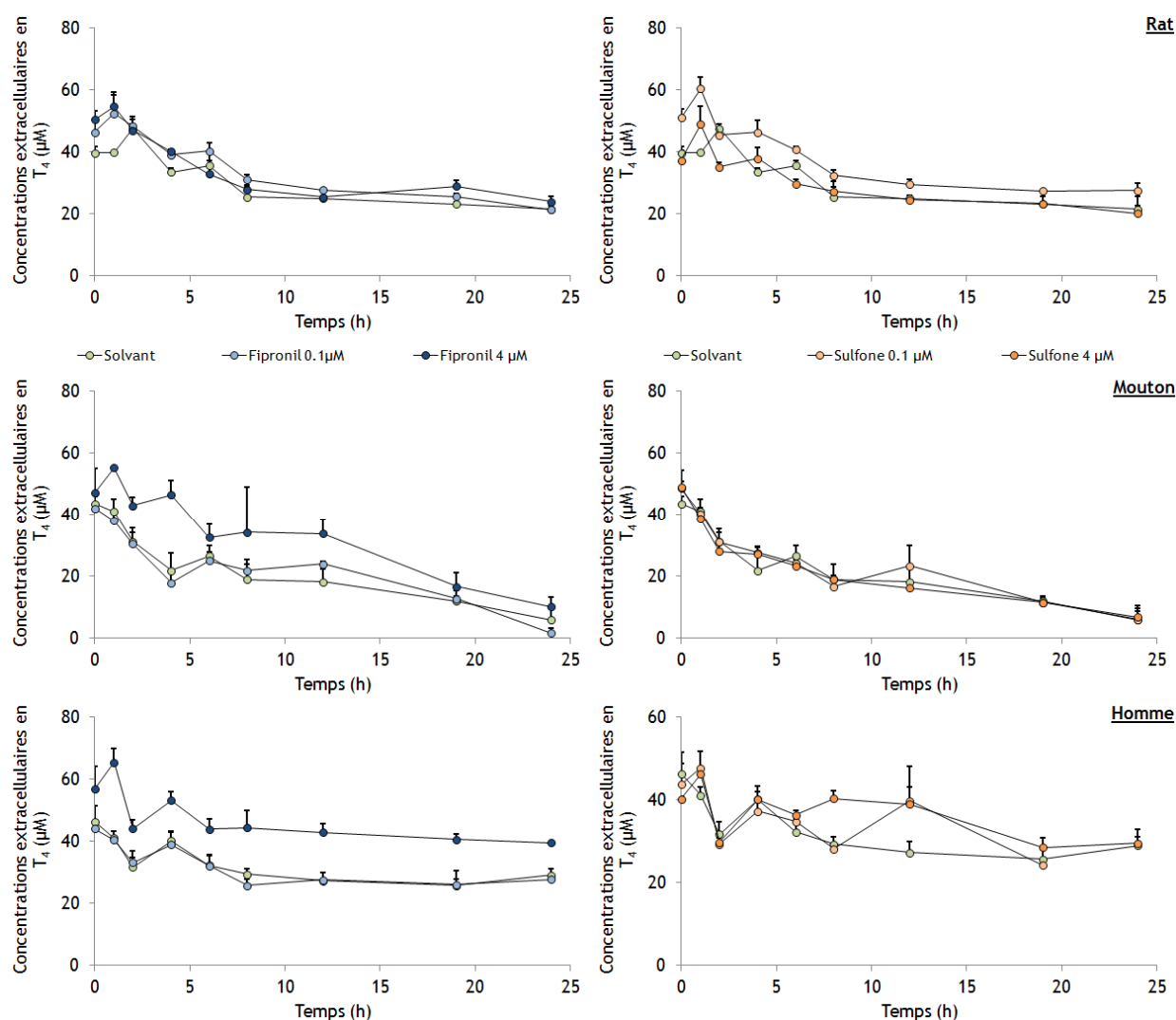


Figure 39: Evolution des concentrations extracellulaires moyennes en T_4 ($\pm$ ET) après incubation d'hépatocytes de rat, de mouton et d'Homme avec du solvant, du fipronil à 0.1 ou 4 μM , ou du fipronil sulfone à 0.1 ou 4 μM .

Les hépatocytes ont été incubés avec les différents traitements à J1 pendant 24h. Ensuite, les concentrations extracellulaires en T_4 ont été mesurées dans le milieu extracellulaire collecté lors du changement de milieu et 1, 2, 4, 6, 8, 12, 19 et 24h après incubation des hépatocytes avec du solvant (vert), du fipronil à 0.1 ou 4 μM (bleu clair ou bleu foncé, graphiques de gauche), ou du fipronil sulfone à 0.1 ou 4 μM (orange clair ou orange foncé, graphiques de droite) à J2. Les concentrations moyennes ont été obtenues à partir des valeurs de trois puits distincts.

Les concentrations extracellulaires en T_4 diminuaient plus rapidement pour les hépatocytes de rat et de mouton, mais n'atteignaient des valeurs proches de la LOQ du dosage que pour les hépatocytes de mouton. La différence entre les deux espèces pourrait être due à une métabolisation de la T_4 différente. Cependant, ces résultats ne sont pas cohérents avec les données obtenues *in vivo* qui montraient une clairance plus importante de la T_4 chez le rat que chez le mouton, suggérant éventuellement une différence de binding de la T_4 entre nos expérimentations *in vivo* et *in vitro*. Ces résultats ne nous ont pas permis de mettre en évidence un effet dose-réponse quelle que soit l'espèce étudiée. Ceci pouvait être dû à une exposition des hépatocytes trop courte pour être en mesure d'observer un effet perturbateur thyroïdien du fipronil et/ou du fipronil sulfone.

3. Conclusions

Lors de cette étude, nous avons été en mesure de montrer que les doses utilisées, conduisant à des concentrations de l'ordre de celles observées chez le rat (Leghait *et al.*, 2009; Roques *et al.*, 2012) ou chez le mouton (Leghait *et al.*, 2010) *in vivo* ou de l'ordre de celles retrouvées chez l'Homme dans le cadre d'une utilisation domestique ou professionnelle du fipronil (AFSSA, 2005, Herin *et al.*, 2011) et/ou d'une intoxication accidentelle à l'insecticide (Mohamed *et al.*, 2004), n'avaient pas d'effet cytotoxique. Cela nous a permis de valider notre modèle de culture primaire d'hépatocytes. Cependant, les valeurs du test au MTT plus faibles pour les hépatocytes humains quel que soit le traitement, conjointement à la faible pénétration cellulaire du fipronil et du fipronil sulfone et à la faible métabolisation de la T_4 nous laissait penser que les conditions de mise en culture des hépatocytes humains devaient être impérativement revues.

Pour ce qui est des hépatocytes de rat ou de mouton, nous avons été en mesure de reproduire les différences interspécifiques décrites en termes de métabolisation du fipronil en fipronil sulfone *in vivo* (Leghait *et al.*, 2009; Leghait *et al.*, 2010). Nos résultats suggéraient également une augmentation du taux de biotransformation du fipronil en fipronil sulfone au cours du temps, ce qui est cohérent avec les données obtenues *in vivo* qui montraient une augmentation de la formation de fipronil sulfone au cours du temps associée à une induction des CYP3A par le fipronil mais aussi par son métabolite (Roques *et al.*, 2012). Enfin, la mesure des concentrations en fipronil et en fipronil sulfone dans le milieu intracellulaire semblait souligner la différence de capacité de métabolisation du fipronil en fipronil sulfone chez le rat et chez le mouton mais également montrer que la différence interspécifique de métabolisation du fipronil chez le rat et le mouton pouvait être liée à une différence de pénétration de l'insecticide dans les hépatocytes.

Pour ce qui est de la mesure de l'expression des cytochromes P450 par In Cell Western dans cette expérimentation, elle n'a pas été présentée ici car aucun effet dose-réponse clair n'a été détecté. Cependant, les résultats chez le rat étaient cohérents avec ceux décrits dans la première expérimentation qui montraient qu'après seulement 24h de traitement, un traitement au fipronil ou au fipronil sulfone à une dose supérieure ou égale à 1 μM était capable d'induire une augmentation de l'expression protéique des CYP3A. En revanche, il n'a pas été possible de déterminer un effet du fipronil et/ou du fipronil sulfone sur la clairance de la T_4 , suggérant que cette durée de traitement des hépatocytes de seulement 24h n'était peut-être pas suffisante pour observer un potentiel effet perturbateur thyroïdien du fipronil.

E. Discussion

Cette étude avait pour but de valider un outil permettant de caractériser sur le plan quantitatif les effets du fipronil et/ou du fipronil sulfone sur le métabolisme hépatique des hormones thyroïdiennes tout en établissant une toxicologie comparative d'espèce de ces effets perturbateurs thyroïdiens afin de déterminer 1) le potentiel perturbateur thyroïdien relatif du fipronil et du fipronil sulfone et 2) qui du rat ou du mouton était le meilleur modèle permettant d'étudier une perturbation thyroïdienne chez l'Homme. Les expérimentations décrites dans cette thèse n'ont pas permis d'atteindre l'objectif fixé. Cependant, cette étude présente des résultats encourageants quand à la capacité de ce modèle de cultures d'hépatocytes à compléter les études menées *in vivo*.

Lors d'un traitement au fipronil, les hépatocytes de rat étaient exposés majoritairement au fipronil sulfone. La biotransformation du fipronil en fipronil sulfone chez le mouton était plus faible. Les différences interspécifiques en termes d'exposition au fipronil et au fipronil sulfone observées *in vivo* (Leghait *et al.*, 2009; Leghait *et al.*, 2010; Roques *et al.*, 2012) ont donc été retrouvées *in vitro*. Il est de plus à noter que la capacité de métabolisation du fipronil en fipronil sulfone des hépatocytes de rat augmentait avec la durée du traitement. En effet, après les premières 24h de traitement au fipronil, les concentrations extracellulaires en fipronil étaient plus hautes et celles en fipronil sulfone étaient plus faibles qu'après 48h d'incubation. Ceci suggérait que l'activité des CYP était plus forte après 48h d'exposition qu'après 24h et était cohérent avec les données obtenues lors d'administrations répétées de fipronil à des rats par voie orale (chapitre 2) qui montraient une augmentation de la formation de fipronil sulfone au cours du temps, compatible avec une induction des CYP.

De plus, *in vitro*, nous avons été capables d'inhiber suffisamment la biotransformation du fipronil en fipronil sulfone pour s'affranchir de l'exposition au fipronil sulfone, ce qui n'avait pas été le cas *in vivo* (chapitre 2). Cependant, un effet propre du piperonyl butoxide sur la clairance de la T_4 a été mis en évidence. Il se traduisait par une diminution de la clairance de la T_4 lors d'un traitement au piperonyl butoxide conjointement au solvant. Ceci suppose que le piperonyl butoxide, inhibiteur de référence des CYP (Institut National de Santé Publique du Québec, 2002), pourrait également inhiber d'autres systèmes enzymatiques impliqués dans le métabolisme des hormones thyroïdiennes. Il pourrait également être envisageable que les CYP inhibés par le piperonyl butoxide participent au métabolisme des hormones thyroïdiennes. Il serait donc intéressant de d'étudier, par exemple en déterminant les profils métaboliques des hormones thyroïdiennes, par quelle voie le piperonyl butoxide inhibe la clairance de la T_4 .

En ce qui concerne les interactions possibles du piperonyl butoxide avec les systèmes enzymatiques reconnus des hormones thyroïdiennes, les quelques données disponibles décrivent plutôt un effet inducteur du piperonyl butoxide sur les UGT hépatiques lors d'une exposition chronique chez le rat (Goldstein *et al.*, 1973). Enfin, pour déterminer les effets perturbateurs thyroïdiens propres du fipronil, il sera nécessaire dans les expérimentations suivantes de tester l'effet d'autres inhibiteurs reconnus des cytochromes P450, comme le 4-(4-chlorobenzyl)pyridine, efficace en particulier *in vitro*, inhibant les CYP2B6 (Korhonen *et al.*, 2007) ou l'un des nombreux inhibiteurs des CYP3A4 (comme par exemple l'érythromycine, le tamoxifène ou le ritonavir, Zhou *et al.*, 2005), le fipronil semblant métabolisé au moins par les CYP2B2 et CYP3A1 chez le rat (Roques *et al.*, 2012) ou leurs orthologues CYP2B6 et CYP3A4 chez l'Homme (Das *et al.*, 2006).

La mesure de l'expression des CYP3A a également montré, comme *in vivo*, qu'un traitement au fipronil et un traitement au fipronil sulfone avaient la capacité d'induire l'activité de ces cytochromes (Roques *et al.*, 2012). Cependant, aucun effet dose-réponse n'a pu être mis en évidence. Cela pourrait être dû à une activation des cytochromes par le fipronil et/ou le fipronil sulfone déjà maximale aux doses utilisées ici.

Pour ce qui est de la clairance de la T₄, nous n'avons pas mis en évidence d'effet perturbateur thyroïdien du fipronil ou du fipronil sulfone. Or, nous avons basé notre approche sur 24h d'exposition seulement au fipronil ou au fipronil sulfone avant d'ajouter de la T₄ au milieu de culture car les résultats sur l'expression protéique des CYP suggéraient que cette durée d'exposition était suffisante pour observer un effet du fipronil ou du fipronil sulfone. Il est cependant possible que les transporteurs des hormones thyroïdiennes et les enzymes responsables de leur métabolisation ne soient pas aussi sensibles à l'effet inducteur du fipronil et requièrent une durée d'exposition plus longue. Ceci est cohérent avec des résultats obtenus au laboratoire *in vivo* chez le rat qui montraient que, malgré une forte exposition des rats au fipronil sulfone après seulement 5 jours de traitement au fipronil suggérant une induction des CYP, aucun effet du fipronil sur la clairance de la T₄ ou l'activité des UGT n'a pu être observé (données du master non présentées).

Il sera alors nécessaire de tester les effets perturbateurs thyroïdiens du fipronil ou du fipronil sulfone sur la clairance de la T₄ dans les différentes espèces sur une plus longue durée de traitement. Cependant, il faut tout même prendre en compte le fait que l'activité des CYP dans les cultures d'hépatocytes de rat peut diminuer de 10 à 30% après 4 jours de mise en culture (Bégué *et al.*, 1984). Il faudra alors déterminer pendant combien de temps les hépatocytes gardent une activité CYP constante attestant du maintien de leur phénotype hépatocytaire. Pour cela, il serait possible de mesurer pour chaque espèce par

In Cell Western l'activité des CYP3A à chaque changement de traitement, soit toutes les 24h, pendant 1 semaine par exemple. Une autre alternative serait d'incorporer toutes les 24h de l'antipyrine, biomarqueur de l'activité des CYP, au milieu de culture et de déterminer si sa clairance évolue au cours du temps. Cependant, il faudrait alors démontrer pour chaque cinétique qu'il n'y a pas d'antipyrine résiduelle provenant de la cinétique précédente, ce qui fausserait les mesures des concentrations extracellulaires. Enfin, les capacités métaboliques des cultures d'hépatocytes de rat, de mouton et d'Homme ne se dégradant probablement pas à la même vitesse, il faudrait modéliser la perte de ces capacités métaboliques dans les trois espèces, ce qui pourrait être fait selon la méthode décrite par Bousquet-Mélou *et al.* (2002) pour modéliser l'évolution de la capacité de métabolisation du cortisol par des hépatocytes de rat au cours du temps.

S'il s'avère alors qu'il faut traiter les hépatocytes au fipronil ou au fipronil sulfone pour observer un effet dose-réponse sur un temps trop long pour conserver en culture primaire une activité CYP satisfaisante, une co-culture d'hépatocytes et de cellules épithéliales de foie pourrait alors être envisagée. En effet, il a été montré que la co-culture d'hépatocytes de rat ou d'Homme avec des cellules de foie Chang (cellules épithéliales sélectionnées pour leur division rapide, leur croissance en monocouche et leur fixation cellulaire et traitées pour ne pas se multiplier en co-culture, Claikens *et al.*, 1987) permettait de maintenir pendant plusieurs jours et à un niveau important les fonctions hépatiques spécifiques telles que la sécrétion de l'albumine ou la métabolisation de médicaments par des voies variées typiques de processus de biotransformation.

Enfin, il serait nécessaire de compléter les données concernant les mécanismes impliquées dans la clairance de la T_4 . En effet, l'évolution des concentrations en T_4 dans le milieu de culture dépend de la capacité d'élimination des hormones thyroïdiennes par les hépatocytes mais également de leur capacité d'absorption de la T_4 dans les cellules par les transporteurs membranaires. Ceci est d'autant plus problématique qu'il est raisonnable de penser qu'en fonction de l'espèce étudiée, les mécanismes enzymatiques et de transport mis en jeu sont différents. Pour déterminer la capacité d'absorption de la T_4 des hépatocytes des différentes espèces, il serait tout d'abord nécessaire de mesurer les concentrations intracellulaires en T_4 conjointement aux concentrations extracellulaires. De plus, le dosage des métabolites des hormones thyroïdiennes comme on l'a vu *in vivo* (Roques *et al.*, 2012) pourrait permettre de mieux caractériser l'implication des désiodases dans la métabolisation de la T_4 à condition d'optimiser la méthode d'analyse. La mesure de l'expression protéique de certaines enzymes impliquées dans le transport ou le métabolisme des hormones thyroïdiennes (UGT1A1, SULT1B1 et OATP) a également été

envisagée mais le signal obtenu par In Cell Western était pour le moment trop faible pour être exploitable.

CHAPITRE 5: MECANISMES MOLECULAIRES DE LA PERTURBATION THYROÏDIENNE ENGENDREE PAR UN TRAITEMENT AU FIPRONIL

A.Problématique, hypothèses et objectifs

Le fipronil est majoritairement transformé en fipronil sulfone chez le rat par les cytochromes P450 hépatiques (Tang *et al.*, 2004). Le fipronil et/ou son métabolite est un perturbateur thyroïdien chez le rat induisant une augmentation de la clairance de la T₄ (Leghait *et al.*, 2009; Roques *et al.*, 2012). Cette perturbation thyroïdienne est associée à une augmentation de l'activité et/ou de l'expression des enzymes hépatiques impliquées dans la métabolisation des hormones thyroïdiennes que sont les UGT et les SULT (Roques *et al.*, 2012). Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans la perturbation thyroïdienne engendrée lors d'un traitement au fipronil ne sont pas connus. Or, une caractérisation de ces mécanismes moléculaires pourrait permettre 1) de documenter les voies enzymatiques hépatiques par lesquelles le fipronil induit une perturbation thyroïdienne 2) d'évaluer via des approches *in vitro* les différences interspécifiques de réponse de ces mécanismes moléculaires, et 3) de développer des tests de criblage pour l'évaluation du potentiel perturbateur thyroïdien d'autres contaminants environnementaux.

Les récepteurs nucléaires xénosenseurs CAR (Constitutive Androstane Receptor) et PXR (Pregnane X Receptor) sont des facteurs de transcription activés par de nombreux xénobiotiques comme les pesticides. Leurs gènes cibles sont impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques et des hormones endogènes dont les hormones thyroïdiennes. En effet, l'activation des récepteurs nucléaires CAR et PXR permet de réguler des enzymes hépatiques de phase I telles que les cytochromes CYP2B et CYP3A et des enzymes hépatiques de phase II (Konno *et al.*, 2008). De plus, le fipronil est décrit comme un ligand du PXR humain *in vitro* (Lemaire *et al.*, 2006). Cela nous a conduit à émettre l'hypothèse que les récepteurs nucléaires CAR et PXR pouvaient être impliqués dans la perturbation thyroïdienne observée lors d'un traitement au fipronil chez le rat.

Pour tester cette hypothèse, nous avons:

- 1) analysé l'impact du fipronil sur le transcriptome hépatique de rat et de souris
- 2) déterminé si l'induction par le fipronil de l'expression hépatique de gènes clés impliqués dans le métabolisme du fipronil ou des hormones thyroïdiennes était dépendante de l'expression des récepteurs nucléaires CAR et PXR en utilisant des souris déficientes pour le récepteur CAR ou pour le récepteur PXR
- 3) évalué si les modulations du profil d'expression génique hépatique induites par ces récepteurs nucléaires présentaient une signification fonctionnelle en termes de métabolisation du fipronil et/ou d'élimination des hormones thyroïdiennes.

B. Impact du fipronil sur le transcriptome hépatique de rat

1. Matériels et méthodes

a. Plan expérimental

Vingt-quatre rates ont été utilisées pour cette expérimentation. Les animaux ont été répartis en deux groupes traités quotidiennement avec du solvant (n = 14) ou du fipronil (n = 10, 3 mg/kg/j) par gavage oro-gastrique pendant 14 jours. Vingt-quatre heures après la dernière administration de solvant ou de fipronil, le sang total a été prélevé par ponction de l'aorte abdominale après asphyxie des animaux au CO₂ et collecté dans des tubes héparinés afin de mesurer les concentrations plasmatiques en fipronil, fipronil sulfone, TT4, FT4, TT3, FT3 et TSH. Les foies ont également été collectés afin de déterminer, en utilisant des puces à ADN pangénomiques (n = 7 pour le groupe solvant et n = 8 pour le groupe fipronil) puis par RT-qPCR, les gènes modulés lors d'un traitement au fipronil.

b. Puces à ADN

L'extraction des ARN hépatiques a été réalisée avec le kit RNeasy Mini kit Plus (Qiagen, Courtaboeuf, France). Les fragments de foies ont été broyés avec du tampon RLT dans des tubes de lyse (Lysing Matrix D, MP Biomedicals, Illkirch, France) à l'aide d'un Fastprep® FP120 (MP Biomedicals, Illkirch, France). Les concentrations d'ARN ont été mesurées avec un Nanodrop 1000 (Labtech, Palaiseau, France). L'intégrité des échantillons d'ARN a été analysée avec des puces RNA 6000 Nano LabChip sur un bioanalyzer 2100 (Agilent, Massy, France). Des ARNc marqués à la cyanine 3 ont été synthétisés par RT puis transcription *in vitro* avec la T7 RNA polymérase à partir de 200 ng d'ARN à l'aide du Low RNA Input Linear Amplification Kit PLUS, One-Color Kit (Agilent, Massy, France). Ils ont été purifiés avec le kit RNeasy Mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). La qualité des ARNc marqués de chaque échantillon de foie a été vérifiée par mesure de l'activité spécifique suivante ($\frac{\text{pmol de Cy3}}{\mu\text{g d'ARNc}}$) au Nanodrop 1000. Les échantillons ont été hybridés sur un microarray d'une puce à ADN 4x44K (PN G4131F) comportant le génome complet de rat (Agilent, Massy, France) selon les instructions du fournisseur. Les lames ont été scannées sur un scanner GenePix 4000B (MDS Analytical Technologies, Saint Grégoire, France).

2. Résultats

a. Effet du traitement sur le poids des animaux

Les poids moyens ($\pm$ ET) des rates traitées au solvant ou au fipronil étaient similaires au début (respectivement $202.1 \pm 5.4\text{g}$ et $202.8 \pm 7.1\text{g}$) et à la fin (respectivement $231.5 \pm 9.0\text{g}$ et $230.5 \pm 10.1\text{g}$) de l'expérimentation.

b. Concentrations plasmatiques en fipronil et en fipronil sulfone

Les concentrations plasmatiques en fipronil étaient proches de la LOQ du dosage de 2.5 ng/mL (moyenne $\pm$ ET: $4.7 \pm 2.8\text{ ng/mL}$). A la fin de l'expérimentation, les rates étaient majoritairement exposées au fipronil sulfone (moyenne $\pm$ ET: $3339.5 \pm 616.9\text{ ng/mL}$). Le rapport fipronil sulfone/fipronil était d'au moins 700, ce qui est cohérent avec les données obtenues chez des rates THX + T_3 traitées au fipronil pendant 14 jours à 1.5 mg/kg/j de fipronil (Roques *et al.*, 2012).

c. Potentiel perturbateur thyroïdien du fipronil

Le traitement au fipronil tendait à faire diminuer significativement la concentration plasmatique de TT4 ($p=0.06$, figure 40) et à faire augmenter significativement celle de TSH ($p<0.01$). Il n'a eu aucun effet significatif sur les concentrations plasmatiques en TT3, FT3 et FT4 ($p>0.05$).

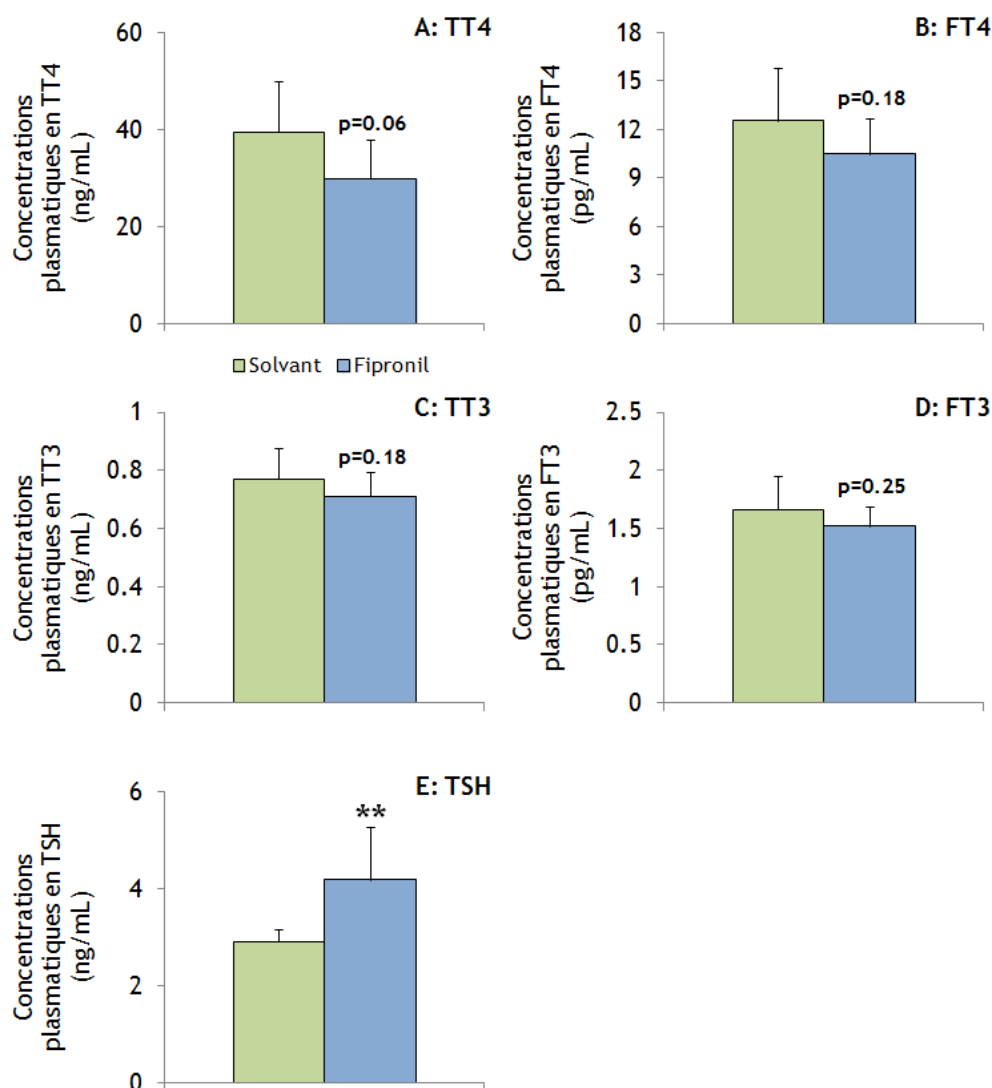


Figure 40: Concentrations plasmatiques moyennes ($\pm$ ET) en TT4, FT4, TT3, FT3 et TSH chez des rates traitées avec du solvant ou du fipronil.

Les concentrations plasmatiques en TT4 (A), FT4 (B), TT3 (C), FT3 (D) et TSH (E) ont été mesurées dans des échantillons de plasma collectés 24h après la dernière administration de solvant (vert, n = 7) ou de fipronil (bleu, n = 8) chez des rates traitées pendant 14 jours. Significativement différent du groupe solvant: **p<0.01.

d. Voies métaboliques hépatiques modulées par le fipronil

Le foie est un organe majeur dans la métabolisation du fipronil (Tang *et al.*, 2004; Das *et al.*, 2006) et des hormones thyroïdiennes (Klachko and Johnson, 1983; Kelly, 2000), c'est pourquoi nous avons étudié les effets du fipronil sur le transcriptome hépatique. Les puces à ADN ont montré qu'après une exposition au fipronil, 402 sondes correspondant à 377 gènes étaient surexprimées et 310 sondes correspondant à 292 gènes étaient sous exprimées (q-value<0.1). L'impact du fipronil sur le transcriptome hépatique du rat est illustré dans la figure 41.

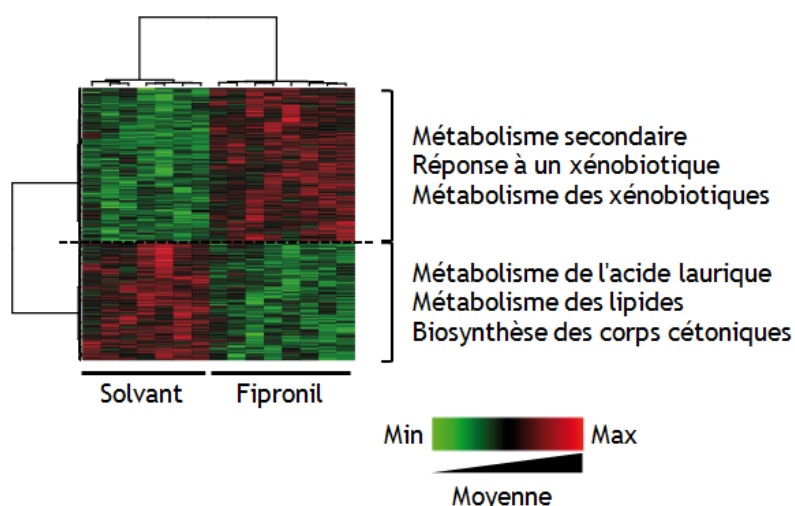


Figure 41: Profil d'expression génique hépatique lors d'un traitement au fipronil chez le rat.

L'étude du transcriptome hépatique de rat a été réalisée sur les foies de 7 rates traitées au solvant et de 8 rates traitées au fipronil (3 mg/kg/j) pendant 14 jours. Les fonctions représentées à droite de la heatmap correspondent aux trois fonctions majoritairement surreprésentées parmi les gènes dont l'expression a été augmentée ou diminuée lors d'un traitement au fipronil.

Les gènes sous exprimés étaient majoritairement liés au métabolisme des lipides. L'effet du fipronil sur ces gènes n'a été confirmé que partiellement par qPCR (figure 42). En effet, sur les quatre gènes présentés ici, seul le gène *Cd36* impliqué dans le transport des acides gras était significativement sous-exprimé lors d'un traitement au fipronil ($p < 0.01$).

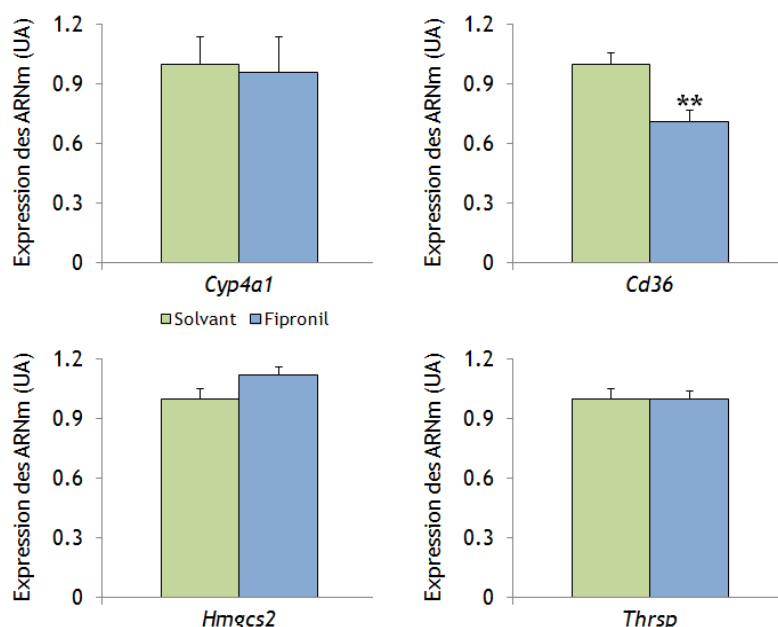


Figure 42: Effet du fipronil sur l'expression des ARNm de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides chez le rat.

L'expression moyenne ($\pm$ ES) des ARNm des gènes *Cyp4a1*, *Cd36*, *Hmgcs2* et *Thrsp* a été déterminée à partir des échantillons de foie de rat prélevés 24h après la dernière administration de solvant (vert, $n = 14$) ou de fipronil (bleu, $n = 10$). Significativement différent du groupe solvant: ** $p < 0.01$.

Ces résultats nous ont conduit à centrer notre étude sur les gènes surexprimés lors d'un traitement au fipronil. Les gènes surexprimés étaient majoritairement liés au métabolisme et au transport des xénobiotiques, des hormones et des composés endogènes comme les acides biliaires et les stéroïdes. Pour évaluer l'hypothèse d'une régulation potentielle de ces gènes par le fipronil via les récepteurs nucléaires CAR et PXR, nous avons comparé nos profils d'expression génique à ceux obtenus par Ren *et al.* (2009) chez des rates exposées à un activateur de CAR et de PXR, le phénobarbital, ou à un activateur uniquement de PXR, la pregnenolone-16alpha-carbonitrile (PCN). Malgré les différences entre les sondes testées avec les puces à ADN Affymetrix et Agilent, nous avons pu montrer qu'environ la moitié des gènes régulés par le fipronil dans le foie de rat étaient aussi régulés par le phénobarbital ou le PCN (figure 43), suggérant bien une activation des récepteurs nucléaires CAR et PXR par le fipronil.

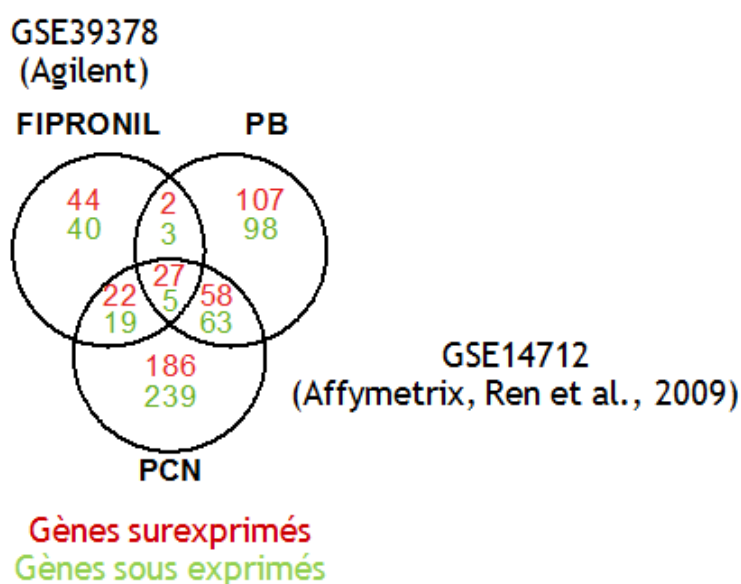


Figure 43: Comparaison des profils d'expression génique hépatiques obtenus lors du traitement de rates avec du fipronil, du phénobarbital ou de la pregnenolone-16alpha-carbonitrile.

PB: phénobarbital, activateur de CAR et de PXR; PCN: pregnenolone-16alpha-carbonitrile, activateur de PXR.

Enfin, les surexpressions de gènes lors d'un traitement au fipronil observées à l'aide des puces à ADN ont été confirmées par qPCR. Nous avons testé plus de 40 gènes. Les gènes les plus significativement modulés par le fipronil sont des cibles des récepteurs nucléaires CAR et PXR (Kiyosawa *et al.*, 2008, figure 44). De plus, il est à noter que ces régulations ont eu lieu malgré une diminution faible mais significative de l'expression des récepteurs nucléaires CAR et PXR lors du traitement au fipronil.

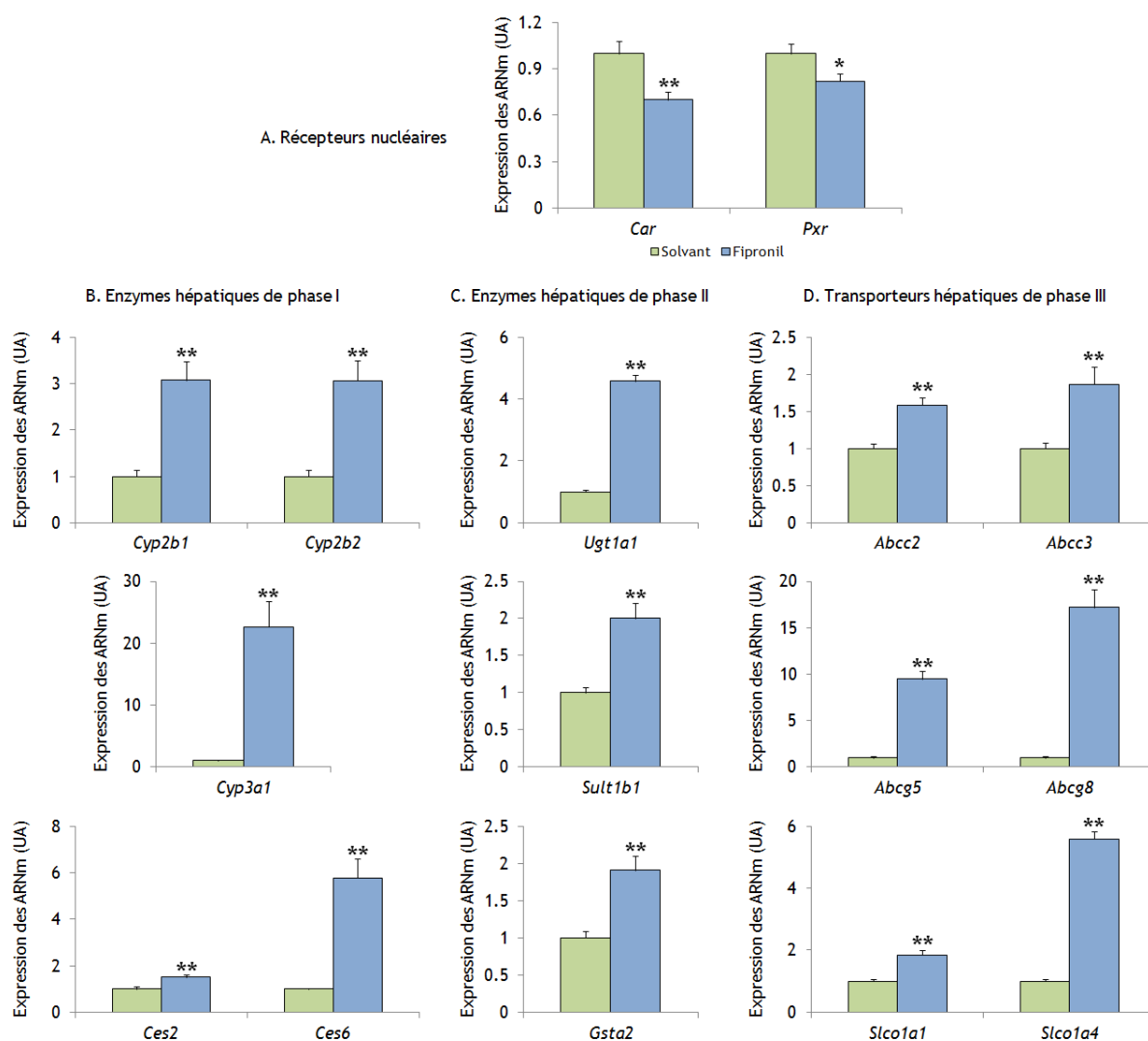


Figure 44: Effet du fipronil sur l'expression des ARNm des récepteurs nucléaires CAR et PXR et des gènes impliqués dans le métabolisme et le transport des xénobiotiques et de composés endogènes comme les hormones thyroïdiennes chez le rat.

L'expression moyenne ($\pm$ ES) des ARNm des récepteurs nucléaires (A), des enzymes hépatiques de phase I (B) ou de phase II (C) et des transporteurs de phase III (D) a été déterminée à partir des échantillons de foie de rat prélevés 24h après la dernière administration de solvant (vert, $n = 14$) ou de fipronil (bleu, $n = 10$). Significativement différent du groupe solvant: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

3. Conclusions

Chez le rat, le fipronil modulait l'expression hépatique de gènes cibles de CAR et/ou de PXR. Afin de démontrer le rôle des récepteurs nucléaires dans ces modulations induites par le fipronil, nous avons alors choisi de comparer les effets d'un traitement au fipronil chez des souris sauvages, *CAR*^{-/-} ou *PXR*^{-/-}. Mais avant de démarrer les expérimentations sur ces souris KO, il était tout d'abord nécessaire de vérifier que le fipronil avait le même effet sur le transcriptome hépatique du rat et de la souris.

C.Impact du fipronil sur le transcriptome hépatique chez la souris

1. Matériels et méthodes

Seize souris mâles de neuf semaines ont été utilisées pour cette expérimentation. Les animaux ont été répartis en deux groupes (n = 8 souris/groupe) traités quotidiennement avec du solvant ou du fipronil (5 mg/kg/j) par gavage oro-gastrique pendant 14 jours. Juste après la dernière administration de solvant ou de fipronil, les foies ont été collectés afin de comparer l'effet du fipronil sur l'expression des ARNm hépatiques chez la souris et le rat.

2. Résultats

a. Effet du traitement sur le poids des animaux et le poids des foies

Les poids moyens ($\pm$ ET) des souris traitées au solvant et au fipronil étaient significativement différents à la fin de l'expérimentation (respectivement 24.7 ± 1.5 g et 23.2 ± 0.8 g, $p < 0.05$) alors qu'ils étaient similaires au début de l'expérimentation (respectivement 23.5 ± 0.9 g et 23.1 ± 0.8 g). Les poids moyens des foies ($\pm$ ET) exprimés en pourcentage des poids corporels étaient respectivement de $4.6 \pm 0.3\%$ et de $5.1 \pm 0.2\%$ à la fin de l'expérimentation pour les groupes traités au solvant ou au fipronil, indiquant une augmentation significative du poids des foies dans le groupe traité au fipronil ($p < 0.01$) résultant probablement de la diminution significative du poids des animaux à la fin de l'expérimentation dans le groupe traité au fipronil.

b. Voies métaboliques hépatiques modulées par le fipronil

Le traitement n'a pas eu d'effet significatif sur l'expression des ARNm des gènes *Cyp4a14*, *Cd36*, *Hmgcs2* et *Thrsp* impliqués dans le métabolisme des lipides (figure 45).

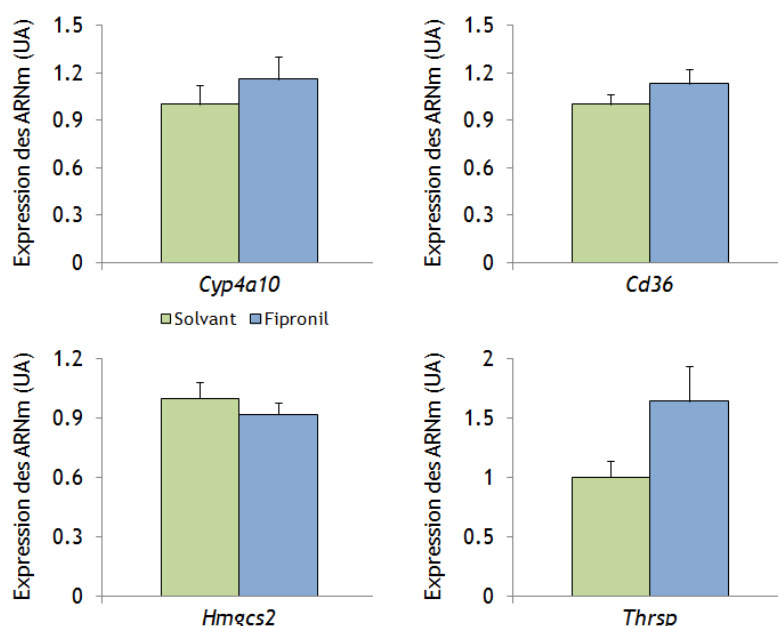


Figure 45: Effet du fipronil sur l'expression des ARNm de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides chez la souris.

L'expression moyenne ($\pm$ ES) des ARNm des gènes *Cyp4a10*, *Cd36*, *Hmgcs2* et *Thrsp* a été déterminée à partir des échantillons de foie de souris prélevés juste après la dernière administration de solvant (vert, $n = 8$) ou de fipronil (bleu, $n = 8$).

Les orthologues des gènes les plus surexprimés lors d'un traitement au fipronil chez le rat étaient aussi surexprimés chez la souris (figure 46). Parmi les enzymes hépatiques de phase I modulées par un traitement au fipronil, les gènes *Cyp2b10* et *Cyp3a11*, cibles prototypiques de CAR et de PXR (Wei *et al.*, 2002), et le gène de la carboxylestérase *Ces2a* étaient les plus fortement surexprimés. L'expression des ARNm des enzymes de phase II *Ugt1a1* et *Sult1b1* impliquées dans le métabolisme des hormones thyroïdiennes (Kester *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2005) était supérieure chez les souris traitées au fipronil que chez celles traitées au solvant, mais l'induction de ces gènes en réponse au traitement au fipronil était plus faible chez la souris que chez le rat même si la dose de fipronil utilisée pour traiter les souris (5 mg/kg/j) était plus élevée que celle utilisée pour traiter les rats (3 mg/kg/j). Ce n'était pas le cas pour l'expression des ARNm de *Gsta2* qui était induite de la même manière chez le rat que chez la souris par un traitement au fipronil. Pour ce qui est des transporteurs membranaires, les gènes les plus surexprimés étaient les gènes *Abcc3* et *Slco1a4*. L'expression des ARNm des transporteurs des stéroïdes *Abcg5* et *Abcg8* était quant à elle également induite par un traitement au fipronil mais plus faiblement chez la souris que chez le rat. Enfin, il est à noter que, chez la souris, le fipronil n'avait pas d'effet significatif sur l'expression des ARNm des récepteurs nucléaires CAR et PXR.

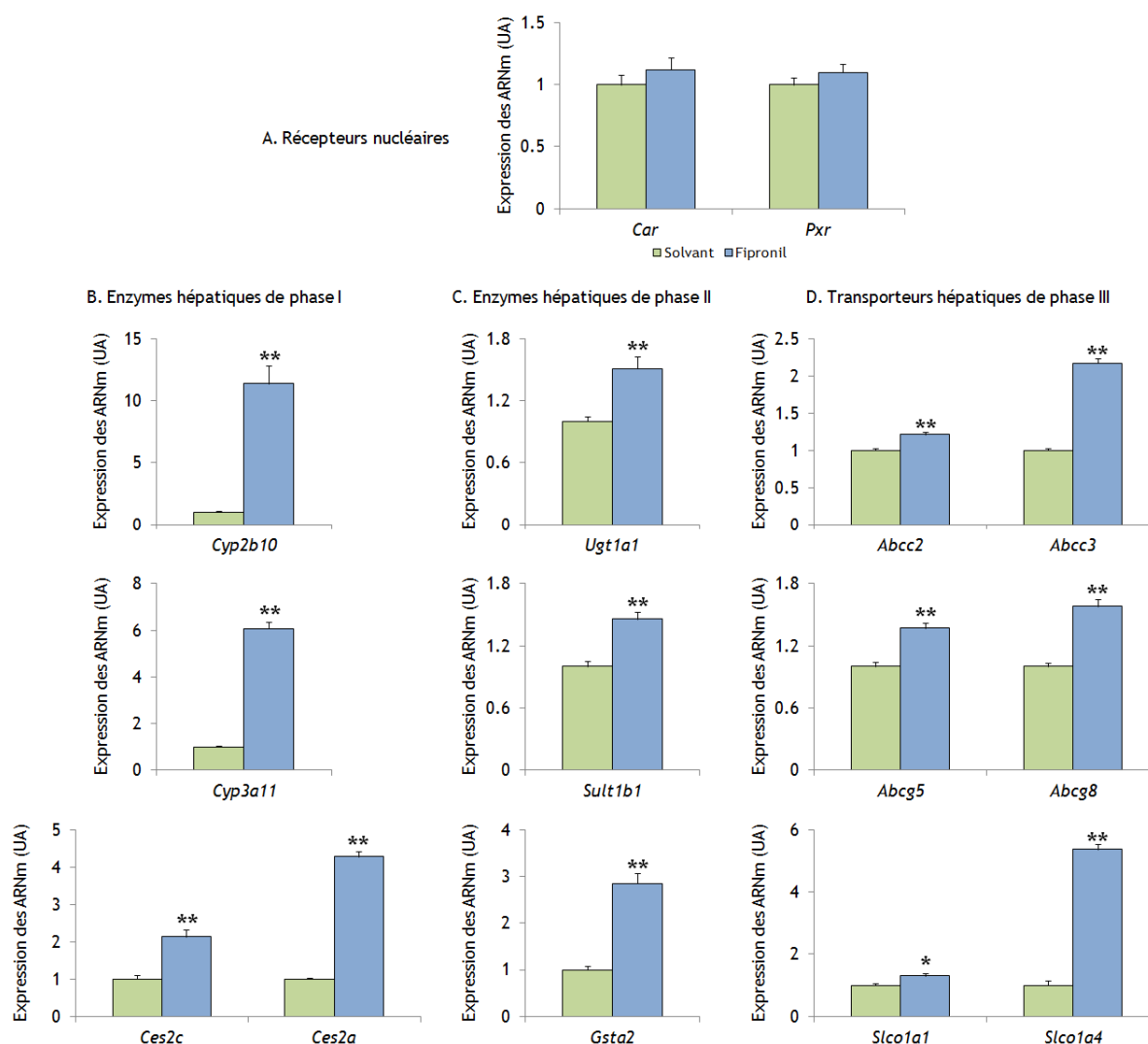


Figure 46: Effet chez la souris du fipronil sur l'expression des ARNm des orthologues des gènes les plus surexprimés chez le rat lors d'un traitement avec l'insecticide.

L'expression moyenne ($\pm$ ES) des ARNm des récepteurs nucléaires (A), des enzymes hépatiques de phase I (B) ou de phase II (C) et des transporteurs de phase III (D) a été déterminée à partir des échantillons de foie de souris prélevés juste après la dernière administration de solvant (vert, $n = 8$) ou de fipronil (bleu, $n = 8$). Significativement différent du groupe solvant: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Nous avons également déterminé par qPCR l'expression d'autres gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques et/ou de composés endogènes mais les régulations observées étaient non significatives ou d'amplitude limitée (figure 47).

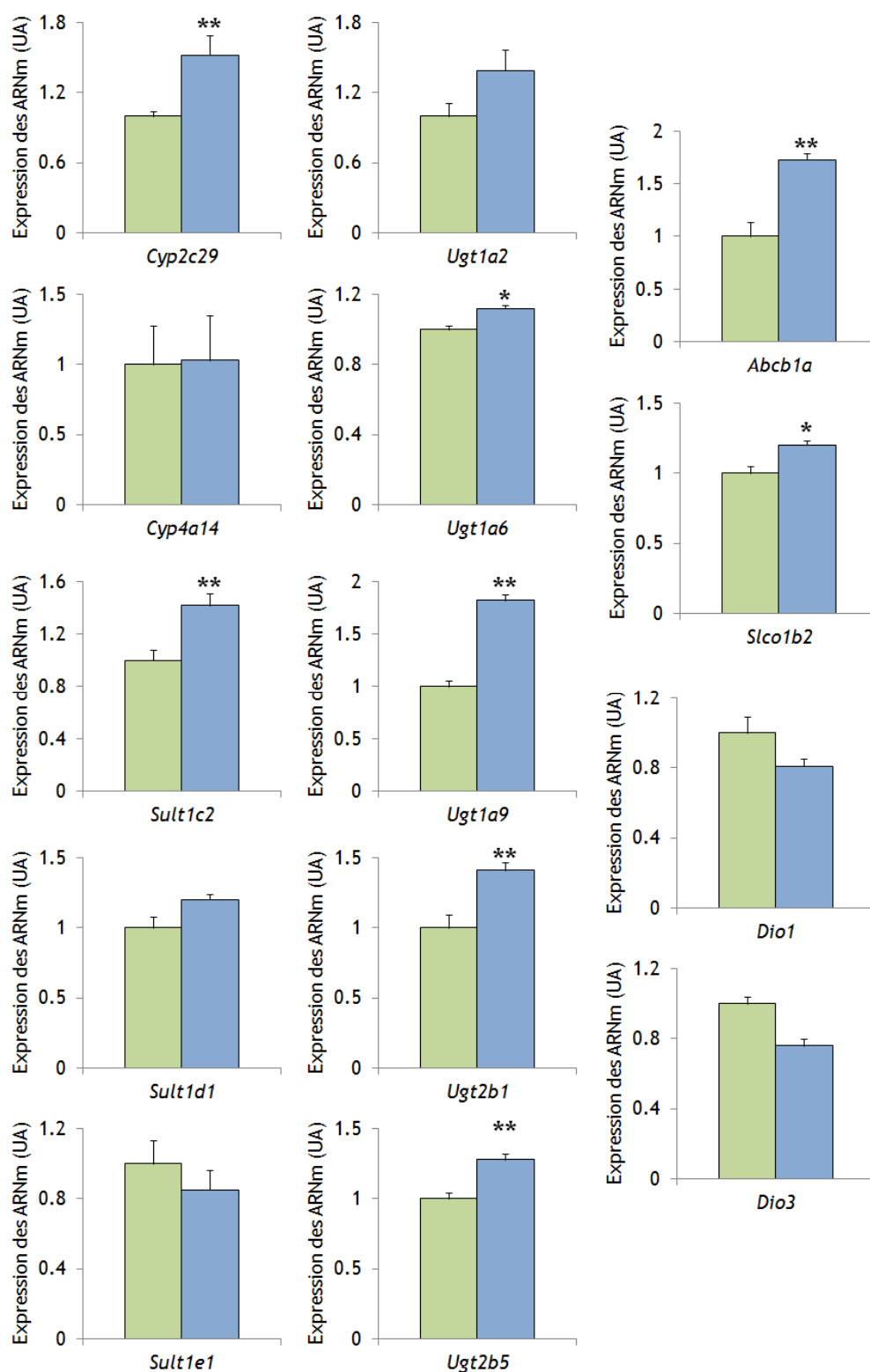


Figure 47: Effet du fipronil sur l'expression des ARNm de gènes impliqués dans le métabolisme et le transport des xénobiotiques et de composés endogènes chez la souris.

L'expression moyenne ($\pm$ ES) des ARNm des enzymes de phase I, II ou III ou des désiodases *Dio1* et *Dio3* a été déterminée à partir des échantillons de foie de souris prélevés juste après la dernière administration de solvant (vert, $n = 8$) ou de fipronil (bleu, $n = 8$). Significativement différent du groupe solvant: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

3. Conclusions

Nous avons montré que le fipronil induisait globalement les mêmes gènes cibles de CAR et de PXR chez le rat et la souris. Cependant, la souris semble moins sensible que le rat aux modulations du profil d'expression génique engendrées par un traitement au fipronil. Nous avons alors choisi de tester les effets du fipronil chez des souris sauvages, déficientes pour le récepteur CAR et déficientes pour le récepteurs PXR seulement sur les gènes les plus différenciellement exprimés chez les souris wild-type soit *Cyp2b10*, *Cyp3a11*, *Ces2a*, *Gsta2*, *Abcc3* et *Slco1a4* afin de déterminer si le profil d'expression génique hépatique induit lors d'un traitement au fipronil était modulé par les récepteurs nucléaires CAR et PXR. De plus, nous avons cherché à savoir si les modulations du profil d'expression génique hépatique induites par les récepteurs nucléaires étaient associées à des répercussions fonctionnelles en termes de métabolisation du fipronil et/ou d'élimination des hormones thyroïdiennes.

D.Implication des récepteurs nucléaires CAR et PXR dans la perturbation thyroïdienne engendrée par un traitement au fipronil

1. Matériels et méthodes

a. Préparation de la solution de $^{13}\text{C}_6\text{-LT}_4$

Une solution concentrée (1 mg/mL) de l'isotope stable de la thyroxine $^{13}\text{C}_6\text{-LT}_4$ (Isosciences, King of Prussia, PA, USA) a été obtenue en diluant la $^{13}\text{C}_6\text{-LT}_4$ dans une solution de NaOH 0.4M/60% d'éthanol. La solution finale de $^{13}\text{C}_6\text{-LT}_4$ (4.17 $\mu\text{g/mL}$) utilisée pour les cinétiques a été obtenue par dilution au 1/240^e de la solution concentrée dans du PBS (Phosphate Buffered Saline) 10mM, pH 7.4 contenant 0.1% (w/v) d'albumine bovine sérique.

b. Plan expérimental

Des souris mâles wild-type, déficientes pour le récepteur CAR ou déficientes pour le récepteur PXR de quinze à vingt-deux semaines ont été utilisées pour cette expérimentation (n = 100 souris/génotype). Les animaux ont été répartis en deux groupes (n = 50 souris de chaque génotype/groupe) traités quotidiennement avec du solvant ou du fipronil (3 mg/kg/j) par gavage oro-gastrique pendant 14 jours. Vingt-quatre heures après la dernière administration de solvant ou de fipronil, les souris ont reçu un bolus ip de $^{13}\text{C}_6\text{-LT}_4$ (10.2 $\mu\text{g/kg}$). Le sang total a été prélevé par ponction intracardiaque sous anesthésie à l'isoflurane et collecté dans des tubes héparinés 0.25, 2, 4, 8, 12 ou 24h après l'administration de $^{13}\text{C}_6\text{-LT}_4$ (n = 5 souris/génotype/traitement pour les temps 0.25 et 4h et n = 10 souris/génotype/traitement pour les temps 2, 8, 12 et 24h) afin de suivre l'évolution des concentrations plasmatiques en $^{13}\text{C}_6\text{-LT}_4$ au cours du temps. Certains échantillons contenant un volume plus important de plasma ont été utilisés pour déterminer les concentrations plasmatiques en fipronil et en fipronil sulfone à la fin de l'expérimentation. Les foies ont été collectés seulement pour les animaux dont le sang a été prélevé 0.25h après l'administration de $^{13}\text{C}_6\text{-LT}_4$ afin d'éviter un effet potentiel de la $^{13}\text{C}_6\text{-LT}_4$ sur l'expression des ARNm modulés par le fipronil.

2. Résultats

a. Effet du traitement et du génotype sur le poids des animaux et le poids des foies

Les poids moyens ($\pm$ ET) des souris $CAR^{-/-}$ et $PXR^{-/-}$ étaient significativement différents de celui des souris sauvages au début de l'expérimentation ($30.7 \pm 2.1g$, $32.4 \pm 4.2g$ et $29.4 \pm 3.4g$ respectivement pour les souris sauvages, $CAR^{-/-}$ et $PXR^{-/-}$, $p < 0.01$) alors que seulement celui des souris $PXR^{-/-}$ était significativement différent de celui des souris sauvages à la fin de l'expérimentation ($29.9 \pm 1.9g$, $30.7 \pm 3.6g$ et $28.4 \pm 2.8g$ respectivement pour les souris sauvages, $CAR^{-/-}$ et $PXR^{-/-}$, $p < 0.01$). Ces différences de poids étaient cependant de faible amplitude. Le traitement n'a pas eu d'effet sur le poids des animaux quel que soit le génotype.

Les poids moyens des foies ($\pm$ ET) exprimés en pourcentage du poids corporel étaient respectivement de $3.9 \pm 0.5\%$, $4.1 \pm 0.6\%$ et $4.2 \pm 0.6\%$ pour les souris sauvages, $CAR^{-/-}$ et $PXR^{-/-}$ traitées au solvant et respectivement de $4.2 \pm 0.5\%$, $3.8 \pm 0.6\%$ et $4.1 \pm 0.4\%$ pour les souris sauvages, $CAR^{-/-}$ et $PXR^{-/-}$ traitées au fipronil, indiquant que ni le génotype, ni le traitement, ni leur interaction n'ont eu d'effet sur le poids des foies.

b. Concentrations plasmatiques en fipronil et en fipronil sulfone

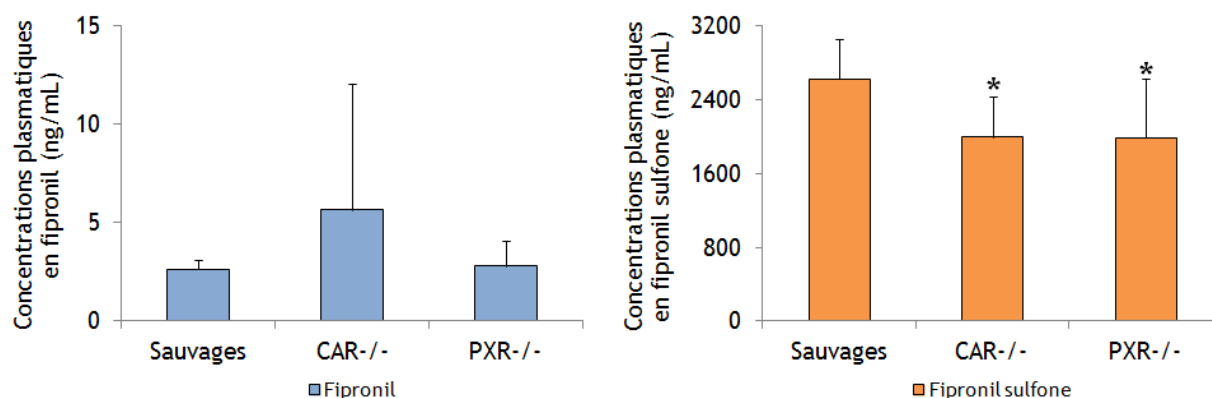


Figure 48: Concentrations plasmatiques moyennes ($\pm$ ET) en fipronil et en fipronil sulfone chez des souris sauvages, $CAR^{-/-}$ et $PXR^{-/-}$ ayant reçu 3 mg/kg/j de fipronil par voie orale pendant 14 jours.

Les concentrations plasmatiques en fipronil (bleu, gauche) et en fipronil sulfone (orange, droite) ont été déterminées chez des souris sauvages ($n = 11$), déficientes pour le récepteur nucléaire CAR ($n = 10$) ou déficientes pour le récepteur nucléaire PXR ($n = 8$) traitées au fipronil (3 mg/kg/j pendant 14 jours). Les échantillons de plasma correspondaient à certains échantillons prélevés pour la cinétique de $^{13}C_6$ -LT₄. Significativement différent du groupe souris sauvages: $*p < 0.05$.

Les concentrations plasmatiques en fipronil étaient proches de la LOQ du dosage de 2.5 ng/mL pour les trois génotypes (figure 48). Les concentrations plasmatiques en fipronil sulfone étaient significativement plus faibles chez les souris KO que chez les souris

sauvages ($p < 0.05$), ce qui semble cohérent compte tenu du rôle des récepteurs nucléaires CAR et PXR dans la régulation des cytochromes P450 responsables de la métabolisation du fipronil en fipronil sulfone (Konno *et al.*, 2008). Cependant, quel que soit le génotype les souris étaient majoritairement exposées au fipronil sulfone. En effet, le rapport fipronil sulfone/fipronil moyen ($\pm$ ET) était respectivement de 1007 ± 152 ; 619 ± 367 et 789 ± 303 pour les souris sauvages, CAR^{-/-} et PXR^{-/-}.

c. Potentiel perturbateur thyroïdien du fipronil

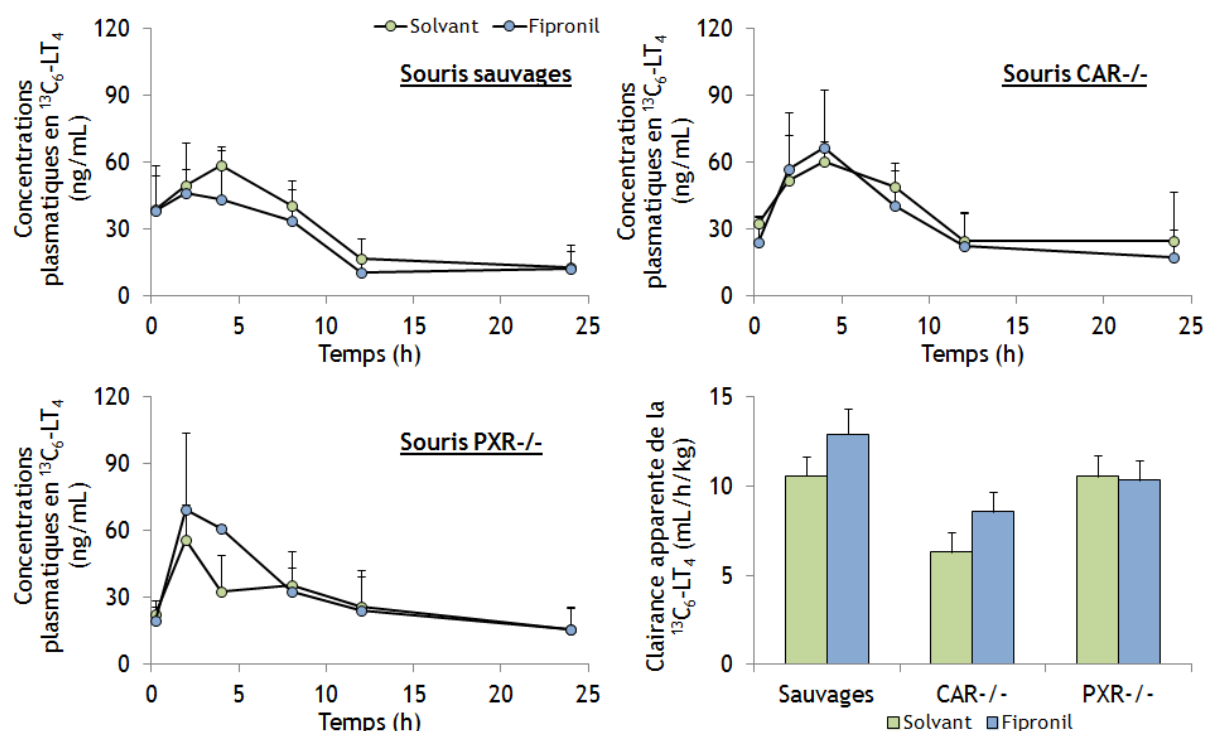


Figure 49: Effet du fipronil sur l'évolution des concentrations plasmatiques et la clairance de la $^{13}\text{C}_6\text{-LT}_4$ chez des souris sauvages, CAR^{-/-} et PXR^{-/-} ayant reçu 3 mg/kg/j de fipronil par voie orale pendant 14 jours.

L'évolution des concentrations plasmatiques moyennes ($\pm$ ET) en $^{13}\text{C}_6\text{-LT}_4$ ainsi que la clairance apparente ($\pm$ SE, correspondant à l'erreur faite sur l'estimation de la clairance par le modèle pharmacocinétique) ont été déterminées à partir des concentrations plasmatiques en $^{13}\text{C}_6\text{-LT}_4$ mesurées dans des échantillons de plasma collectés 0.25, 2, 4, 8, 12 et 24h après administration d'un bolus ip de $^{13}\text{C}_6\text{-LT}_4$ (10.2 $\mu\text{g/kg}$) à des souris sauvages, déficientes pour le récepteur nucléaire CAR ou déficientes pour le récepteur nucléaire PXR traitées pendant 14 jours au solvant (vert, $n = 5$ ou 10 souris/génotype/traitement) ou au fipronil (bleu, $n = 5$ ou 10 souris/génotype/traitement).

Les concentrations plasmatiques moyennes en $^{13}\text{C}_6\text{-LT}_4$ étaient plus élevées dans le groupe solvant que dans le groupe traité au fipronil pour tous les temps de la cinétique chez les souris sauvages mais pas chez les souris KO (figure 49). La clairance de la $^{13}\text{C}_6\text{-LT}_4$ tendait à être plus haute chez les souris sauvages traitées au fipronil que chez celles traitées au solvant. On observait le même effet chez les souris CAR^{-/-} même si la clairance de la $^{13}\text{C}_6\text{-LT}_4$ semblait plus faible constitutivement chez ces souris que chez les souris

sauvages. La clairance de la $^{13}\text{C}_6\text{-LT}_4$ semblait similaire chez les souris $\text{PXR}^{-/-}$ traitées au solvant ou au fipronil. Aucun effet significatif du génotype ou du traitement n'a cependant été mis en évidence.

d. Voies métaboliques hépatiques modulées par le fipronil

Etonnamment, il n'y a pas eu d'effet du traitement chez ces souris sauvages pour les gènes *Cyp2b10* et *Gsta2* (figure 50) contrairement à ce qui a été montré chez les souris sauvages traitées à 5 mg/kg/j de fipronil dans l'expérimentation précédente. Il est de plus à noter que, chez les souris traitées au solvant, l'absence de CAR entraînait une diminution significative des ARNm des gènes *Cyp2b10* et *Cyp3a11* et l'absence de PXR une diminution significative des ARNm du gène *Slco1a4*, suggérant un effet de CAR ou de PXR sur l'expression constitutive de ces gènes. Une augmentation significative de l'expression des gènes *Cyp3a11*, *Ces2a*, *Abcc3* et *Slco1a4* a été observée lors du traitement des souris sauvages au fipronil. Cet effet était absent chez les souris $\text{PXR}^{-/-}$ pour tous les gènes, absent chez les souris $\text{CAR}^{-/-}$ pour les gènes *Ces2a* et *Abcc3* et réduit chez les souris $\text{CAR}^{-/-}$ pour les gènes *Cyp3a11* et *Slco1a4*, suggérant une implication des récepteurs nucléaires CAR et PXR dans les modulations du profil d'expression génique engendrées par un traitement au fipronil.

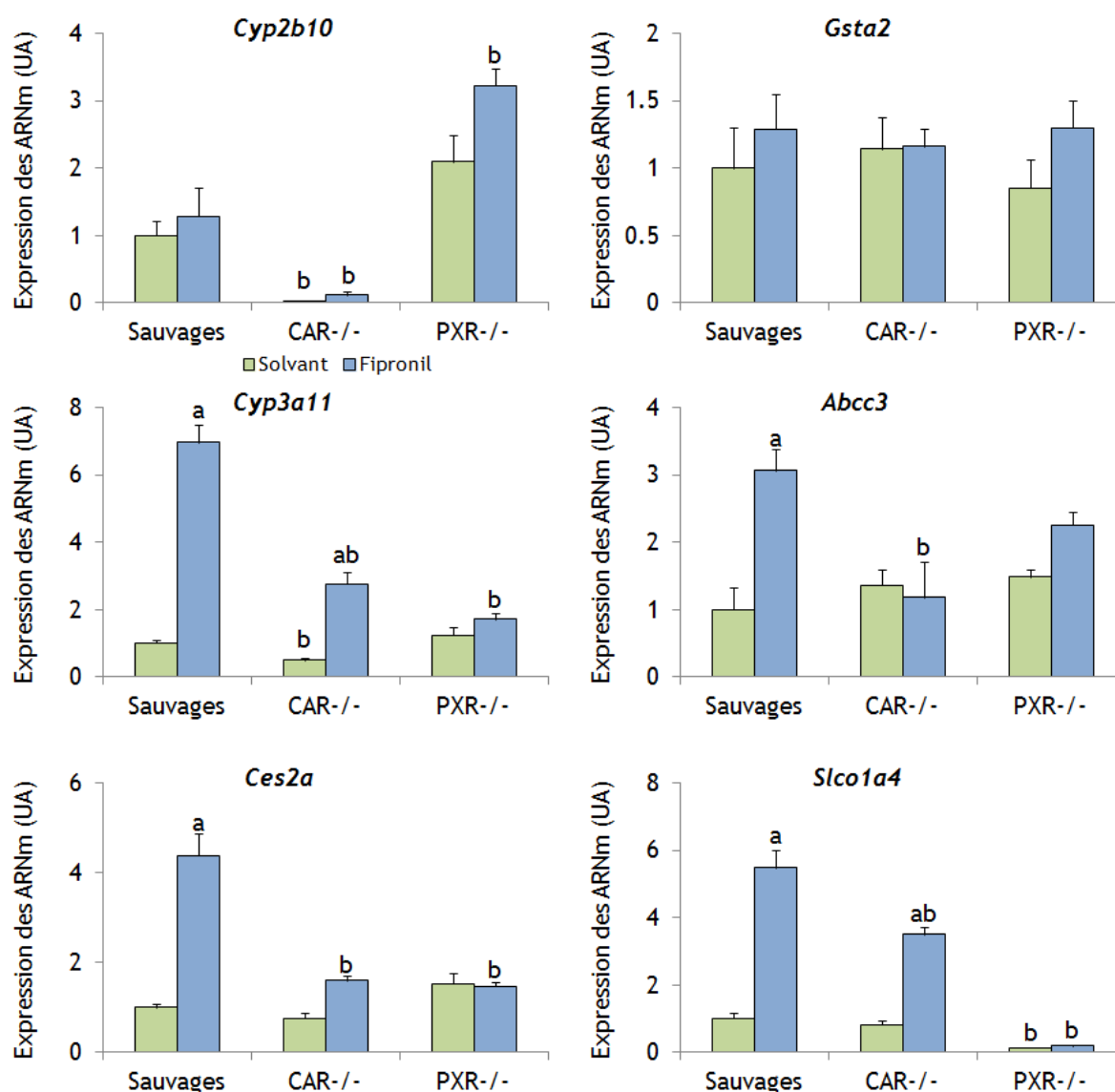


Figure 50: Effet du fipronil sur l'expression des gènes *Cyp2b10*, *Cyp3a11*, *Ces2a*, *Gsta2*, *Abcc3* et *Slco1a4* chez des souris sauvages, *CAR*^{-/-} et *PXR*^{-/-} ayant reçu 3 mg/kg/j de fipronil par voie orale pendant 14 jours.

L'expression moyenne ($\pm$ ES) des ARNm de ces gènes a été déterminée à partir des échantillons de foie prélevés 24h après la dernière administration de solvant (vert, n = 5 souris/génotype) ou de fipronil (bleu, n = 5 souris/génotype). Significativement différent du groupe solvant: a, p<0.05. Significativement différent du groupe souris sauvages: b, p<0.05.

3. Conclusions

Les récepteurs nucléaires CAR et PXR semblaient être impliqués dans la régulation du métabolisme du fipronil via la modulation de l'expression des cytochromes P450 responsables de la métabolisation du fipronil en fipronil sulfone. De plus, les deux récepteurs nucléaires, et plus particulièrement PXR, semblaient être impliqués dans la modulation par le fipronil de l'expression d'enzymes hépatiques impliquées dans la métabolisation et le transport des hormones thyroïdiennes. Cependant, nous n'avons pas

été en mesure de reproduire les effets du fipronil sur *Cyp2b10* et *Gsta2* qui étaient induits chez les souris sauvages plus jeunes et traitées au fipronil à 5 mg/kg/j utilisées dans l'expérimentation précédente. De plus, nous n'avons pas été en mesure de déterminer de façon formelle l'implication des récepteurs nucléaires CAR et PXR dans l'augmentation de la clairance de la $^{13}\text{C}_6\text{-LT}_4$ observée lors d'un traitement au fipronil chez le rat. Nos résultats montraient donc que la souris était moins sensible à la perturbation thyroïdienne engendrée par un traitement au fipronil que le rat. Nous avons alors choisi d'évaluer l'impact d'une dose plus importante de fipronil (10 mg/kg/j) chez des souris sauvages, déficientes pour le récepteur CAR et déficientes pour le récepteur PXR âgées de 9 semaines, un âge identique à celui des souris traitées à 5 mg/kg/j utilisées dans l'expérimentation précédente.

E. Effet d'une forte dose de fipronil sur la régulation de l'expression de gènes hépatiques chez de jeunes souris sauvages, CAR^{-/-} et PXR^{-/-}

1. Matériels et méthodes

Des souris mâles wild-type, déficientes pour le récepteur CAR ou déficientes pour le récepteur PXR de neuf semaines ont été utilisées pour cette expérimentation (n = 16 souris/génotype). Les animaux ont été répartis en deux groupes (n = 8 souris de chaque génotype/groupe) traités quotidiennement avec du solvant ou du fipronil (10 mg/kg/j) par gavage oro-gastrique pendant 14 jours. Juste après la dernière administration de solvant ou de fipronil, le sang total a été prélevé par ponction intracardiaque sous anesthésie à l'isoflurane et collecté dans des tubes héparinés afin de déterminer les concentrations plasmatiques en T₄ totale et en T₃ totale. Les foies ont été collectés afin de déterminer l'expression des ARNm hépatiques modulés par le fipronil.

2. Résultats

a. Effet du traitement et du génotype sur le poids des animaux et le poids des foies

Le poids moyen ($\pm$ ET) des souris CAR^{-/-} était significativement différent de celui des souris PXR^{-/-} à la fin de l'expérimentation ($26.1 \pm 1.3g$, $26.4 \pm 2.2g$ et $24.7 \pm 1.8g$ respectivement pour les souris sauvages, CAR^{-/-} et PXR^{-/-}, $p < 0.05$) alors que les poids moyens ($\pm$ ET) étaient similaires pour tous les génotypes au début de l'expérimentation ($25.7 \pm 1.2g$, $26.3 \pm 2.1g$ et $25.0 \pm 2.0g$ respectivement pour les souris sauvages, CAR^{-/-} et PXR^{-/-}). Le traitement n'a pas eu d'effet sur le poids des animaux quel que soit le génotype.

Les poids moyens des foies ($\pm$ ET) exprimés en pourcentage du poids corporel étaient respectivement de $4.8 \pm 0.3\%$, $4.8 \pm 0.4\%$ et $5.1 \pm 0.3\%$ pour les souris sauvages, CAR^{-/-} et PXR^{-/-} traitées au solvant et respectivement de $4.8 \pm 0.6\%$, $4.9 \pm 0.4\%$ et $4.7 \pm 0.6\%$ pour les souris sauvages, CAR^{-/-} et PXR^{-/-} traitées au fipronil, indiquant que ni le génotype, ni le traitement, ni leur interaction n'ont eu d'effet sur le poids des foies.

b. Potentiel perturbateur thyroïdien du fipronil

Quel que soit le génotype, le traitement au fipronil n'a pas eu d'effet sur les concentrations plasmatiques en TT4 et en TT3 ($p > 0.05$, figure 51).

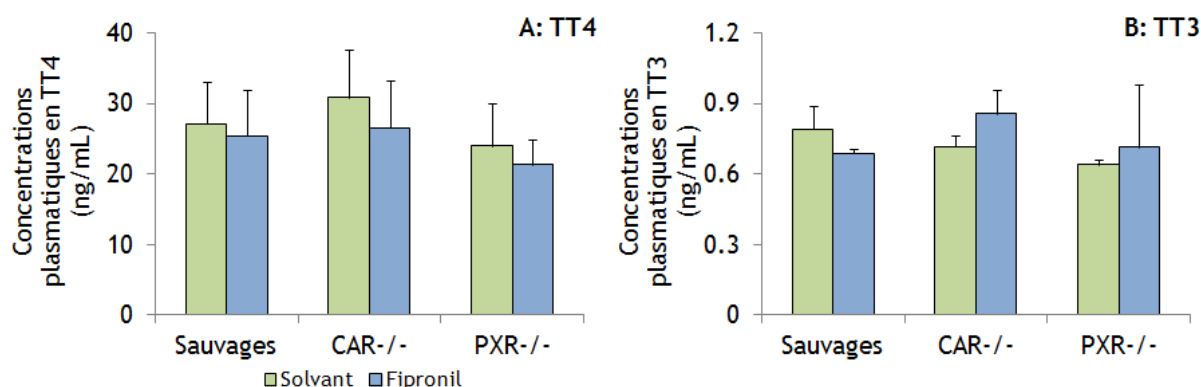


Figure 51: Concentrations plasmatiques moyennes ($\pm$ ET) en TT4 et en TT3 chez des souris sauvages, CAR^{-/-} ou PXR^{-/-} ayant reçu 10 mg/kg/j de fipronil par voie orale pendant 14 jours.

Les concentrations plasmatiques en TT4 (A) et en TT3 (B) ont été mesurées dans des échantillons de plasma collectés juste après la dernière administration de solvant (vert, $n = 8$ souris/génotype pour la TT4 et 3 souris/génotype pour la TT3) ou de fipronil (bleu, $n = 8$ souris/génotype pour la TT4 et 3 souris/génotype pour la TT3) chez des souris traitées pendant 14 jours.

c. Voies métaboliques hépatiques modulées par le fipronil

Chez les souris traitées au solvant, l'absence de CAR entraînait une diminution significative des ARNm des gènes *Abcc3* et *Slco1a4* et l'absence de PXR une diminution significative des ARNm des gènes *Cyp2b10*, *Ces2a*, *Abcc3* et *Slco1a4*, suggérant un effet de CAR ou de PXR sur l'expression constitutive de ces gènes (figure 52). Contrairement à l'expérimentation précédente, une augmentation significative de l'expression de tous les gènes a été observée lors du traitement des souris sauvages au fipronil. Cet effet était absent chez les souris PXR^{-/-} pour les gènes *Cyp3a11*, *Ces2a*, *Abcc3* et *Slco1a4*, absente chez les souris CAR^{-/-} pour les gènes *Cyp2b10* et *Gsta2*, réduite chez les souris PXR^{-/-} pour le gène *Cyp2b10* et réduite chez les souris CAR^{-/-} pour les gènes *Cyp3a11* et *Slco1a4*, suggérant comme dans l'expérimentation précédente une implication des récepteurs nucléaires CAR et PXR dans les modulations du profil d'expression génique engendrées par un traitement au fipronil.

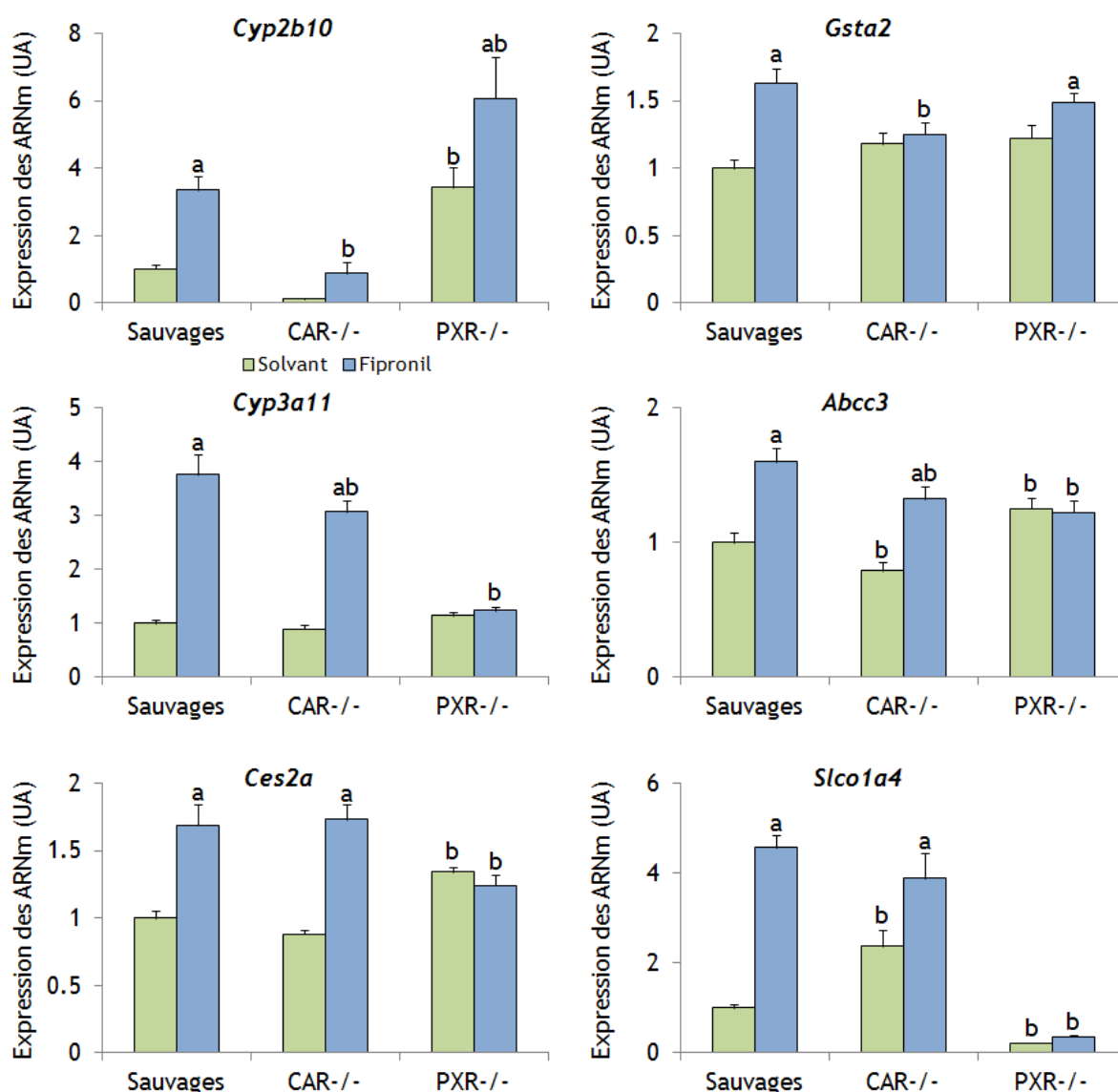


Figure 52: Effet du fipronil sur l'expression des gènes *Cyp2b10*, *Cyp3a11*, *Ces2a*, *Gsta2*, *Abcc3* et *Slco1a4* chez des souris sauvages, *CAR*^{-/-} et *PXR*^{-/-} ayant reçu 10 mg/kg/j de fipronil par voie orale pendant 14 jours.

L'expression moyenne ($\pm$ ES) des ARNm de ces gènes a été déterminée à partir des échantillons de foie prélevés juste après la dernière administration de solvant (vert, $n = 8$ souris/génotype) ou de fipronil (bleu, $n = 8$ souris/génotype). Significativement différent du groupe solvant: a, $p < 0.05$. Significativement différent du groupe souris sauvages: b, $p < 0.05$.

3. Conclusions

Comme dans l'expérimentation précédente, les récepteurs nucléaires CAR et PXR semblaient être impliqués dans la régulation du métabolisme du fipronil car ils modulaient l'expression des cytochromes P450 responsables de la métabolisation du fipronil en fipronil sulfone. De plus, les deux récepteurs nucléaires, et surtout PXR, étaient impliqués dans la modulation par le fipronil de l'expression d'enzymes hépatiques impliquées dans la métabolisation et le transport des hormones thyroïdiennes. Enfin, contrairement à ce qui a

été observé dans l'expérimentation précédente, tous les gènes induits chez les souris sauvages traitées avec 5 mg/kg/j de fipronil l'étaient aussi chez des souris sauvages traitées avec 10 mg/kg/j de fipronil. Malgré ces modulations d'expression observées au niveau des ARNm, nous n'avons pas observé d'impact significatif du fipronil, même à forte dose, sur les concentrations en hormones thyroïdiennes circulantes chez la souris. La souris était donc bien moins sensible à la perturbation thyroïdienne engendrée par un traitement au fipronil que le rat. Ceci ne nous a donc pas permis d'évaluer les conséquences en termes de perturbation thyroïdienne des modulations d'expression génique dépendantes de CAR et de PXR.

F. Discussion

Cette étude a démontré que, chez le rat, un traitement au fipronil conduisait à une diminution des concentrations plasmatiques en T_4 et à une augmentation de la TSH. Ceci est cohérent avec les résultats précédemment obtenus par Leghait *et al.* (2009). En effet, après 14 jours de traitement, le fipronil induisait également une diminution des concentrations en hormones thyroïdiennes circulantes conjointement à une augmentation de la TSH plasmatique. L'effet perturbateur thyroïdien du fipronil était associé dans les études précédentes à une augmentation de l'activité et/ou de l'expression des UGT1A et des SULT conjuguant les phénols impliquées dans la métabolisation des hormones thyroïdiennes (Leghait *et al.*, 2009; Roques *et al.*, 2012). Une induction de l'expression des *Ugt1a1* et des *Sult1b1* a été retrouvée dans cette étude. Or, il a été montré qu'un traitement de souris avec des agonistes de CAR comme le phénobarbital ou le TCPOBOP, induisait également une diminution des hormones thyroïdiennes via une augmentation de leur glucuronoconjugaison et de leur sulfoconjugaison et à une augmentation des concentrations en TSH (Qatanani *et al.*, 2005). Le récepteur nucléaire CAR pourrait donc jouer un rôle dans l'effet perturbateur thyroïdien engendré par un traitement au fipronil. Un autre récepteur nucléaire xénosenseur, le récepteur PXR, pourrait également être impliqué. En effet, le fipronil est décrit comme un ligand du PXR humain *in vitro* (Lemaire *et al.*, 2006).

Cette hypothèse d'une implication des récepteurs nucléaires CAR et PXR dans la perturbation thyroïdienne engendrée par un traitement au fipronil chez le rat semblait cohérente avec nos résultats concernant l'étude du transcriptome hépatique de rats exposés au fipronil. En effet, nous avons montré une induction des gènes *Cyp2b2* et *Cyp3a1* qui concordait avec celle décrite précédemment lors d'un traitement au fipronil chez le rat (Roques *et al.*, 2012) et avec les données obtenues sur hépatocytes humains (Das *et al.*, 2004) qui montraient que le fipronil induisait les *Cyp2b6* et *Cyp3a4* humains, orthologues des *Cyp2b1/Cyp2b2* et *Cyp3a1* de rat. Or, ces gènes, impliqués dans la métabolisation du fipronil en fipronil sulfone (Tang *et al.*, 2004; Das *et al.*, 2006), sont des cibles prototypiques des récepteurs nucléaires CAR et PXR (Wei *et al.*, 2002). De plus, nous avons montré une induction de l'expression des ARNm des carboxylestérases *Ces2* et *Ces6*. Or, le PCN, ligand de PXR, le phénobarbital et le TCPOBOP sont décrits comme des inducteurs de *Ces6* dans le foie (Xu *et al.*, 2009).

Concernant les enzymes de phase II, hormis une induction des *Ugt1a1* et des *Sult1b1* inductibles via l'activation de CAR ou de PXR (Vansell and Klaassen, 2002; Chen *et al.*, 2003; Maglich *et al.*, 2004; Xie, 2008; Szabo *et al.*, 2009), le fipronil induisait

également l'expression du gène *Gsta2* impliqué dans la métabolisation de la bilirubine probablement via l'activation de PXR (Xie, 2008). Enfin, le traitement au fipronil entraînait une surexpression des gènes *Abcc2*, *Abcc3*, *Abcg5*, *Abcg8*, *Slco1a1* et *Slco1a4*. Les gènes *Abcc2*, *Abcc3* et *Slco1a4* codent pour les protéines MRP2, MRP3 et OATP1A4 chez le rat. Or, ces transporteurs membranaires d'influx (OATP) ou d'efflux (MRP) sont connus pour transporter les hormones thyroïdiennes (Feldt-Rasmussen and Rasmussen, 2007; Lecureux *et al.*, 2009) et être des cibles de CAR et de PXR (Staudinger *et al.*, 2001; Szabo *et al.*, 2009). Les gènes *Slco1b3* et *Slco1c1* codant chez le rat pour les protéines OATP1B2 et OATP1C1 également impliquées dans le transport des hormones thyroïdiennes (Feldt-Rasmussen and Rasmussen, 2007; Visser *et al.*, 2011) ont été induits par le fipronil mais plus faiblement que les transporteurs cités plus haut (données non présentées). Enfin, il est à noter que les gènes *Slc16a2* et *Slc16a10* codant pour les protéines MCT8 et MCT10 transportant les hormones thyroïdiennes (Feldt-Rasmussen and Rasmussen, 2007; Visser *et al.*, 2011) n'ont quant à eux pas été différentiellement exprimés entre les groupes solvant et fipronil (données non présentées).

Compte tenu du rôle central du foie dans la métabolisation des hormones thyroïdiennes, il est vraisemblable que les modulations du profil d'expression génique hépatique induites par le fipronil chez le rat soient à l'origine de l'effet perturbateur thyroïdien du fipronil. L'ensemble de nos données indiquaient que les récepteurs CAR et surtout PXR jouaient un rôle majeur dans l'induction par le fipronil de l'expression hépatique de gènes impliqués dans le métabolisme et le transport des hormones thyroïdiennes. Les modulations transcriptionnelles hépatiques lors d'un traitement au fipronil chez le rat ont été en majorité retrouvées chez la souris. Cependant, même si la dose administrée aux souris était plus haute que celle administrée aux rats (5 mg/kg/j ou 10 mg/kg/j vs. 3 mg/kg/j), certains gènes étaient moins surexprimés chez la souris que chez le rat suggérant une plus faible sensibilité des souris aux effets du fipronil sur le transcriptome hépatique. C'est en particulier le cas pour les enzymes de phase II impliquées dans la conjugaison des hormones thyroïdiennes et de leurs métabolites. On ne peut exclure que les différences de sensibilité au fipronil entre les rats et les souris soient dues à une différence de genre entre les rats et les souris utilisées dans nos études. En effet, les études chez le rat étaient menées sur des femelles afin de rester dans les mêmes conditions que lors de nos précédentes études ayant montré un effet perturbateur thyroïdien du fipronil (Leghait *et al.*, 2009; Roques *et al.*, 2012). Les études sur les souris étaient quant à elles menées sur des mâles afin de s'affranchir d'une source potentielle de variabilité liée au cycle œstral, plus critique chez la souris sachant que pour la cinétique de $^{13}\text{C}_6\text{-LT}_4$ nous ne pouvions faire qu'un prélèvement par souris. Or, des différences dans

l'expression de gènes hépatiques en fonction du sexe ont déjà été mises en évidence chez l'Homme et sur différents modèles animaux lors d'une induction de troubles hépatiques par l'éthanol par exemple (Tadic *et al.*, 2002).

Cette moindre sensibilité de la souris a été notamment retrouvée en ce qui concerne l'effet du fipronil sur la clairance de la T₄ ou les concentrations circulantes en hormones thyroïdiennes. En effet, aucun effet perturbateur thyroïdien n'a pu être détecté que ce soit chez les souris traitées à la même dose de fipronil que les rats (3 mg/kg/j) ou à une dose plus haute (10 mg/kg/j). Nous n'avons donc pas été en mesure de déterminer si les modulations du profil d'expression génique hépatique induites par les récepteurs nucléaires lors d'un traitement au fipronil présentaient une signification fonctionnelle en termes d'élimination des hormones thyroïdiennes. Néanmoins, en mesurant l'expression des gènes les plus surexprimés par un traitement au fipronil chez des souris sauvages, déficientes pour le récepteur CAR ou déficientes pour le récepteur PXR, nous avons pu mettre en évidence que les récepteurs nucléaires CAR et PXR étaient impliqués dans la régulation du métabolisme du fipronil et de la perturbation thyroïdienne car ils régulaient l'expression d'ARNm codant pour des enzymes responsables de la biotransformation du fipronil ou du métabolisme et du transport des hormones thyroïdiennes.

Enfin, ces résultats complétaient les données préexistantes concernant les différences interspécifiques existant en termes de perturbation thyroïdienne induite par un traitement au fipronil. En effet, il a déjà été montré que le mouton, espèce moins exposé que le rat au fipronil sulfone, était moins sensible à la perturbation thyroïdienne que ce dernier (Leghait *et al.*, 2009; Leghait *et al.*, 2010). Il semble donc critique dans les expérimentations futures de déterminer la pertinence des différents modèles animaux en termes d'étude d'une perturbation thyroïdienne résultant d'une augmentation du métabolisme hépatique des hormones thyroïdiennes pour conclure sur un potentiel effet perturbateur du fipronil chez l'Homme.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Cette thèse nous a permis de proposer un schéma physiopathologique de la perturbation thyroïdienne engendrée par un traitement au fipronil chez le rat (figure 53).

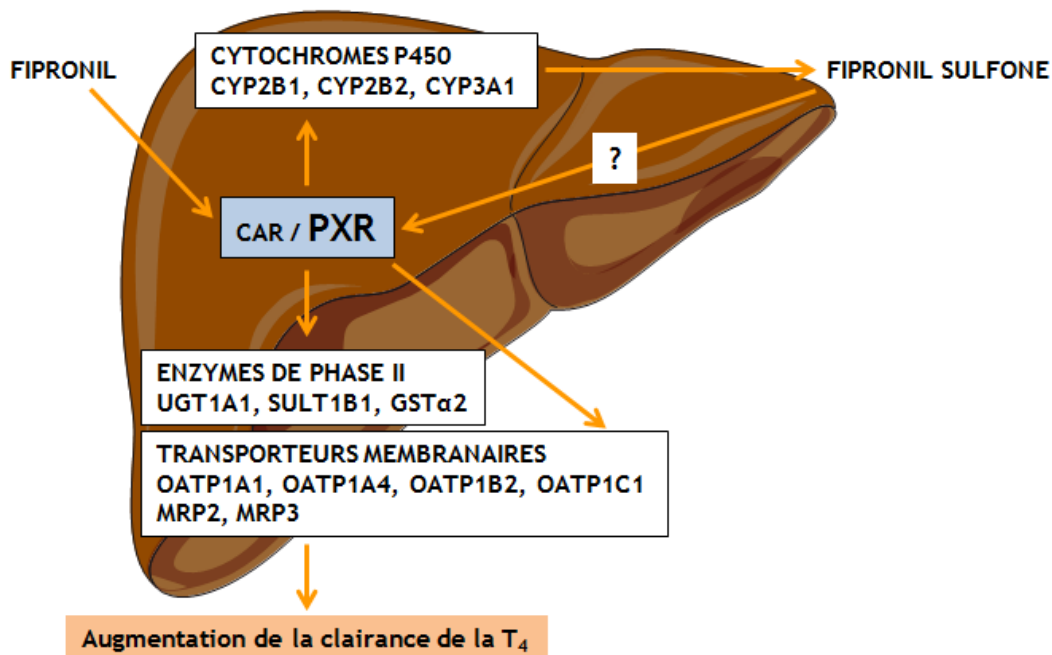


Figure 53: Proposition d'un schéma physiopathologique de la perturbation thyroïdienne engendrée par un traitement au fipronil chez le rat.

Dans la première partie, nous avons montré que le fipronil et son principal métabolite formé *in vivo*, le fipronil sulfone, étaient fortement et rapidement absorbés par voie orale. De plus, la biotransformation par le foie du fipronil en fipronil sulfone semblait être la voie d'élimination majeure du fipronil. Nous avons ensuite montré dans la deuxième partie que quel que soit le paramètre étudié, les effets d'un traitement au fipronil sulfone étaient strictement identiques à ceux d'un traitement au fipronil. En effet, les deux traitements augmentaient la clairance de la T_4 et celle de l'antipyrine, diminuaient les concentrations plasmatiques en T_3 et en T_2 et induisaient l'activité des UGT, l'expression protéique des CYP3A et l'expression des ARNm des *Ugt1a1*, des *Sult1b1*, des *Cyp2b2* et des *Cyp3a1*. Un traitement au fipronil sulfone seul permettait donc de reproduire les effets d'un traitement au fipronil sur la perturbation thyroïdienne et l'activation des CYP chez le rat. Le fipronil sulfone pourrait donc être responsable de la perturbation thyroïdienne engendrée par un traitement au fipronil chez cette espèce.

Plusieurs éléments limitaient la portée de nos expériences *in vivo* pour l'évaluation des risques de perturbation thyroïdienne pour l'Homme: 1) des différences interspécifiques concernant le métabolisme hépatique des hormones thyroïdiennes et/ou du fipronil (Emi *et al.*, 2007; Visser *et al.*, 1998; Leghait *et al.*, 2009; Leghait *et al.*, 2010; chapitre 4), 2) l'utilisation de doses conduisant à des concentrations plasmatiques très largement

supérieures à celles reportées chez des personnes exposées au fipronil, et 3) la difficulté à discriminer les effets propres du fipronil de ceux de son métabolite. Afin de combler certaines de ces lacunes, nous avons complété notre étude *in vivo* par une étude *in vitro* dans la troisième partie ayant pour but de comparer le métabolisme hépatique des hormones thyroïdiennes et du fipronil et d'établir une courbe dose (fipronil, fipronil sulfone) - réponse (perturbation thyroïdienne) chez plusieurs espèces dont l'Homme afin 1) de caractériser sur le plan quantitatif le potentiel perturbateur thyroïdien du fipronil et 2) d'évaluer quelle espèce animale entre le rat et le mouton était le meilleur modèle permettant d'étudier une perturbation thyroïdienne chez l'Homme. Nous avons pu reproduire *in vitro* dans nos modèles animaux les différences interspécifiques observées *in vivo* en termes de biotransformation du fipronil en fipronil sulfone. Les données obtenues sur hépatocytes humains tendaient à suggérer que cette biotransformation est plus faible que chez le rat mais cela nécessite d'être confirmé, de même que la possibilité du fipronil et/ou du fipronil sulfone à augmenter le catabolisme des hormones thyroïdiennes *in vitro*.

Enfin, il nous paraissait nécessaire pour mieux caractériser les différences interspécifiques en termes de perturbation thyroïdienne engendrée par un traitement au fipronil de mieux connaître les mécanismes à l'origine de cette perturbation thyroïdienne. La dernière partie avait donc pour but d'appréhender les mécanismes moléculaires impliqués dans la perturbation thyroïdienne induite par un traitement au fipronil, et plus particulièrement d'évaluer l'implication des récepteurs nucléaires CAR et PXR dans cette perturbation thyroïdienne chez le rongeur. Cette étude a montré que les deux récepteurs nucléaires étaient impliqués dans la régulation du métabolisme hépatique du fipronil via l'induction de l'expression génique de CYP et dans la régulation de l'expression génique d'enzymes de phase II et de transporteurs membranaires jouant un rôle dans la perturbation thyroïdienne chez le rat.

Ce dernier chapitre a pour objectif de mettre en perspective ce travail de thèse en proposant des pistes pour compléter notre étude et mieux évaluer à terme le potentiel perturbateur thyroïdien du fipronil chez l'Homme.

. Comment avoir une vision plus large, plus exhaustive des mécanismes d'action du fipronil sur le métabolisme hépatique des hormones thyroïdiennes ?

L'étude des effets perturbateurs thyroïdiens du fipronil chez le rat a montré que l'augmentation de la clairance de la T_4 était associée à une augmentation de l'activité et/ou de l'expression des ARNm des UGT et des SULT impliquées dans la conjugaison de la T_4 . Chez la souris, où l'augmentation de la clairance de T_4 est beaucoup plus modérée, l'induction des ARNm des UGT et des SULT était fortement réduite par rapport aux observations faites chez le rat. A travers l'établissement du profil métabolique des

hormones thyroïdiennes chez le rat, nous avons cherché à déterminer si d'autres voies métaboliques pouvaient être sollicitées lors d'un traitement au fipronil comme la voie de désiodation par le dosage de la T_4 , la T_3 , la rT_3 et la T_2 . Cependant, nous n'avons pas été en mesure de déterminer si la diminution des concentrations plasmatiques en T_3 et en T_2 étaient dues à une diminution de la production de la T_3 et de la T_2 ou à une augmentation de la conjugaison et donc de l'élimination de ces métabolites car:

- l'injection de T_3 lors de la cinétique de T_4 ne permettait pas de déterminer si les concentrations plasmatiques en T_3 mesurées provenaient de la T_3 exogène ou de la T_3 potentiellement formée par désiodation de la T_4 ,
- la limite de quantification était trop haute pour la rT_3 (0.2 ng/mL) par rapport aux concentrations physiologiques observées chez le rat (0.04 à 0.07 ng/mL, Lachowicz *et al.*, 2009) ce qui n'a pas permis de connaître la capacité de désiodation de la T_4 en rT_3 et de la rT_3 en T_2 ,
- l'absence de dosage des métabolites glucuronoconjugués et sulfoconjugués ne permettait pas de déterminer la capacité d'élimination des hormones thyroïdiennes et de leurs métabolites par cette voie.

De plus, les concentrations plasmatiques en MIT et en DIT présentait des variations de concentrations plasmatiques au cours du temps difficilement interprétables. Pour ce qui est des voies de désamination des hormones thyroïdiennes, la limite de quantification du Triac (5 ng/mL) était trop haute par rapport aux concentrations physiologiques observées chez le rat (environ 0.3 ng/mL, Medina-Gomez *et al.*, 2008) et celle du Tetrac (25 ng/mL) n'a pas pu être abaissée à cause du faible pourcentage d'extraction de ce métabolite. Enfin, la sélectivité de la méthode entre les trois isomères de la T_2 (3,3'-diiodothyronine, 3',5'-diiodothyronine et 3,5-diiodothyronine) n'a pas été évaluée. Le dosage des métabolites des hormones thyroïdiennes qui aurait pu nous renseigner sur la contribution d'autres voies métaboliques que celles impliquées dans la conjugaison et/ou la désiodation des hormones thyroïdiennes n'était donc pas assez performant pour nous permettre de conclure quand à l'implication de ces voies dans l'effet perturbateur thyroïdien du fipronil. Le dosage de ces métabolites avec une bonne spécificité et une bonne sensibilité devra ainsi être amélioré car c'est un élément clé de compréhension de la perturbation thyroïdienne induite par des toxiques hépatiques. A cela pourra s'ajouter une quantification des conjugués des hormones thyroïdiennes par LC/MS/MS après hydrolyse enzymatique ou par quantification directe si des standards sont synthétisés au préalable *in vitro* (Hays and Hsu, 1987; Tong *et al.*, 2007).

L'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la perturbation thyroïdienne engendrée par un traitement au fipronil a montré que l'expression des ARNm de certains

transporteurs transmembranaires d'influx et d'efflux des hormones thyroïdiennes était augmentée lors d'un traitement au fipronil. Ce résultat permettait d'envisager l'hypothèse selon laquelle l'effet du fipronil sur la clairance de la T₄ résulterait à la fois d'une augmentation du transport cellulaire des hormones thyroïdiennes et d'une induction de leurs voies métaboliques au niveau hépatique.

Il est donc important de compléter nos études concernant les modulations du métabolisme et du transport des hormones thyroïdiennes par le fipronil, et notamment d'y intégrer la notion de différences interspécifiques. Le modèle d'hépatocytes en culture pourrait de ce point de vue se révéler être un outil pertinent. En effet, c'est un modèle qui se prête bien aux manipulations pharmacologiques des transporteurs et des systèmes enzymatiques en général, et qui permettrait également d'accéder à du matériel humain pour aborder des aspects de toxicologie comparative d'espèce. Il serait par exemple envisageable sur ce modèle d'hépatocytes de comparer la clairance de la T₄ avec ou sans inhibiteurs des transporteurs des hormones thyroïdiennes (tableau 20).

Transporteur	Inhibiteurs
MRP2	Probenecid, Cyclosporine, PSC833, MK571
MRP3	Probenecid, Benzbromarone, MK571
OATP1A2	Dexaméthasone, Erythromycine, Vérapamil
OATP1B1	Acide glycyrrhizique, Cyclosporine A, FK-506
OATP1B3	Acide glycyrrhizique

Tableau 20: Exemples d'inhibiteurs des transporteurs transmembranaires des hormones thyroïdiennes chez l'Homme.

D'après Vähäkangas and Myllynen, 2009.

Cependant, il est à noter que la difficulté de cette étude résiderait dans la détermination d'inhibiteurs bloquant les mêmes transporteurs chez les trois espèces. De plus, certains de ces inhibiteurs sont également des inhibiteurs des cytochromes P450. C'est le cas par exemple de l'érythromycine qui inhibe les CYP3A4 chez l'Homme (Zhou *et al.*, 2005). Une alternative à l'emploi d'inhibiteurs des transporteurs transmembranaires serait alors l'utilisation de siRNA (small interfering RNA) spécifiques d'un transporteur qui transfectés dans les hépatocytes des différentes espèces auraient pour conséquence de détruire spécifiquement les ARNm de ce transporteur et d'empêcher la traduction de la protéine codée par cet ARNm. Il existe par exemple dans le commerce des plasmides pour la production de vecteurs lentiviraux, voire directement des particules lentivirales, permettant la transfection de siRNA dirigés contre l'OATP1A2 ou le MRP2 chez l'Homme ou la souris (Santa Cruz Biotechnology Inc, Heidelberg, Germany). L'absence d'expression de la

protéine pourrait être détectée par Western blot grâce aux anticorps anti-OATP1A2 ou anti-MRP2 du même fournisseur.

Enfin, afin de mieux appréhender les différences interspécifiques en termes de métabolisme des hormones thyroïdiennes, ce qui est critique si l'on veut à terme évaluer la pertinence de nos résultats *in vivo* par rapport à l'Homme, il est nécessaire d'approfondir notre connaissance des voies de métabolisation des hormones thyroïdiennes. Une approche novatrice devrait être mise en œuvre au laboratoire dans la ligne directe de ce travail de thèse et réside dans le développement d'un outil performant permettant l'établissement de profils métaboliques détaillés des hormones thyroïdiennes *in vivo*. Brièvement, l'objectif de ce projet est d'établir un profil métabolique des hormones thyroïdiennes aussi exhaustif que possible par l'identification de toutes les molécules iodées circulantes. Pour ce faire, il est prévu 1) d'établir un radiochromatogramme après administration *in vivo* de T₄ marquée à l'¹²⁵I avec ou sans inducteur du métabolisme des hormones thyroïdiennes, 2) d'isoler les molécules iodées dans toutes les fractions ayant présenté un pic de radioactivité 3) de procéder à une analyse structurale de ces molécules en utilisant la spectrométrie de masse haute résolution.

- **Comment mieux comprendre l'implication des récepteurs nucléaires dans la modulation du métabolisme hépatique des hormones thyroïdiennes ?**

L'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la perturbation thyroïdienne engendrée par un traitement au fipronil nous a permis de suggérer un rôle de CAR et surtout de PXR dans cette perturbation. Cependant, les études sur les souris déficientes pour le récepteur nucléaire CAR ou pour le récepteur nucléaire PXR n'ayant pas permis d'établir un lien entre les modulations du profil d'expression génique hépatique induites via les récepteurs nucléaires et une répercussion fonctionnelle en terme d'élimination des hormones thyroïdiennes, l'implication des deux récepteurs nucléaires dans la perturbation thyroïdienne observée chez le rat lors d'un traitement au fipronil mériterait d'être confirmée. Pour cela, il serait envisageable d'étudier les modulations du profil d'expression génique hépatique et la perturbation thyroïdienne chez des rats sauvages, déficients pour le récepteur nucléaire CAR ou déficients pour le récepteur nucléaire PXR. Les rats déficients pour le récepteur PXR sont par ailleurs déjà disponibles dans le commerce (Sigma Advanced Genetic Engineering). Après avoir déterminé quels sont les gènes cibles de CAR et de PXR qui pourraient être impliqués dans la perturbation thyroïdienne, il serait intéressant d'identifier quels sont ceux qui sont impliqués dans l'induction d'une perturbation thyroïdienne résultant d'une augmentation du métabolisme hépatique des hormones thyroïdiennes. L'utilisation *in vivo* de siRNA délivrés via des adénovirus à des rats pourrait permettre d'inhiber certaines de ces voies métaboliques et de déterminer si on

observe alors toujours une diminution des concentrations en hormones thyroïdiennes circulantes lors de l'administration d'un perturbateur thyroïdien comme le fipronil.

- **Comment identifier les sources de variabilité interspécifique afin d'évaluer la pertinence de nos résultats par rapport à l'étude du potentiel perturbateur thyroïdien du fipronil chez l'Homme ?**

Il est à noter que pour chaque étape du schéma physiopathologique des effets du fipronil que nous avons proposé chez le rat - métabolisme du fipronil, implication des récepteurs nucléaires CAR et PXR, transport et métabolisme des hormones thyroïdiennes - il existe des différences interspécifiques importantes.

En ce qui concerne le transport ou le métabolisme des hormones thyroïdiennes, des différences interspécifiques dans les isoformes impliquées dans l'élimination des hormones thyroïdiennes ont été décrites (Emi *et al.*, 2007; Visser *et al.*, 1998). Une caractérisation des profils métaboliques des hormones thyroïdiennes dans les trois espèces *in vitro* pourrait permettre de comparer les voies métaboliques des hormones thyroïdiennes mises en jeu lors d'un traitement au fipronil chez le rat, le mouton et l'Homme. De plus, l'absence de TBG, protéine de liaison plasmatique des hormones thyroïdiennes, chez le rat le rendrait plus sensible à la perturbation thyroïdienne que le mouton, la TBG étant supposée jouer un rôle protecteur face au catabolisme des hormones thyroïdiennes. Pour s'affranchir de la différence interspécifique concernant la TBG, il pourrait être intéressant de comparer les effets du fipronil dans la même espèce avec des individus exprimant ou n'exprimant pas la TBG. Il pourrait alors être envisagé d'observer les effets perturbateurs thyroïdiens du fipronil chez le rat exprimant la TBG au cours de la période post-natale ou au cours de la sénescence. On pourrait aussi comparer les effets du fipronil chez deux espèces n'exprimant pas la TBG et présentant une exposition différente au fipronil sulfone comme le rat et le chat.

En ce qui concerne l'implication des récepteurs nucléaires CAR et PXR, des spécificités de ligand de ces récepteurs ont été décrites chez l'Homme et la souris (cf. introduction). De plus, la moindre sensibilité de la souris à la perturbation thyroïdienne engendrée par un traitement au fipronil (chapitre 5) étant associée à une induction moins forte des cibles de CAR et de PXR que chez le rat, on peut penser que le fipronil pourrait être un ligand plus faible de ces récepteurs chez la souris que chez le rat. Pour mettre cette hypothèse à l'épreuve, il serait possible *in vitro* de déterminer si le fipronil est un ligand de CAR et/ou de PXR chez plusieurs espèces, en utilisant le système de gène rapporteur décrit par Lemaire *et al.* (2006). Ce système a déjà par exemple permis de déterminer que le fipronil est un ligand du PXR humain. Cependant, ce système ne tient pas compte des coactivateurs et des corépresseurs associés aux récepteurs nucléaires ou

des éléments de réponse des enzymes hépatiques qui peuvent être propres à chaque espèce. Une autre alternative serait de déterminer l'effet perturbateur thyroïdien du fipronil sur des souris, ou préférentiellement sur des rats, "humanisés" c'est-à-dire invalidés pour le gène CAR ou PXR murin auxquels on aurait incorporé le gène CAR ou PXR humain. Ces souris sont déjà disponibles dans le commerce (Taconic Farms Inc.) et il existe même un modèle de souris humanisées conjointement pour le récepteur CAR, le récepteur PXR et le cytochrome 3A4/3A7.

- **Quelle pourrait être la conséquence sur d'autres tissus que le tissu hépatique d'une augmentation du métabolisme des hormones thyroïdiennes ?**

Les études menées au cours de cette thèse ont été ciblées sur les effets d'un traitement au fipronil sur le métabolisme hépatique des hormones thyroïdiennes. En effet, le foie est un organe majeur à la fois dans la métabolisation du fipronil (Tang *et al.*, 2004; Das *et al.*, 2006) et dans celle des hormones thyroïdiennes (Klachko and Johnson, 1983; Kelly, 2000). De plus, les récepteurs nucléaires CAR et PXR potentiellement impliqués dans la médiation des effets perturbateurs thyroïdiens du fipronil ont une distribution tissulaire réduite principalement limitée au foie, à l'intestin et au rein (Robert, 2010). Cependant, l'étude des effets d'une potentielle perturbation thyroïdienne sur d'autres tissus que le foie peut être critique. En effet, un des dangers de la perturbation thyroïdienne potentiellement induite par un traitement au fipronil chez l'Homme pourrait être lié à l'exposition des femmes enceintes à l'insecticide, une perturbation thyroïdienne du fœtus étant critique compte tenu du rôle majeur des hormones thyroïdiennes dans les processus de croissance et de développement (Yen, 2001). Il pourrait alors être intéressant pour déterminer le potentiel effet perturbateur thyroïdien du fipronil chez le fœtus de déterminer *in vivo* l'effet du fipronil sur les concentrations en hormones thyroïdiennes circulantes chez la mère mais également sur le transport et le métabolisme des hormones thyroïdiennes au niveau du placenta. Pour cela, une étude *in vivo* chez le rat, ou le mouton plus proche de l'Homme en termes de physiologie de la gestation, suivi d'une étude sur un modèle *ex vivo* de perfusion de placenta humain pourrait être envisagée. Ce type d'approche est en cours de validation au sein du laboratoire pour l'étude des effets du BPA au cours de la gestation. Brièvement, la phase *in vivo* permettrait de déterminer si lors d'une administration de fipronil à la mère, l'insecticide traverse la barrière placentaire et si on observe une modification des profils métaboliques des hormones thyroïdiennes chez la mère comme chez le fœtus. L'étude *ex vivo* sur placenta humain perfusé pourrait ensuite permettre de s'affranchir des différences interspécifiques en termes de métabolisme du fipronil et/ou de métabolisme et de transport au travers du placenta des hormones thyroïdiennes afin d'évaluer le risque du fipronil pour la santé humaine.

ARTICLE TOXICOLOGIE COMPARATIVE *IN VIVO*

CYP450-dependent biotransformation of the insecticide fipronil into fipronil sulfone can mediate fipronil-induced thyroid disruption in rats.

Roques, B. B., Lacroix, M. Z., Puel, S., Gayrard, V., Picard-Hagen, N., Jouanin, I., Perdu, E., Martin, P. G., Viguié, C.

Toxicological Sciences, 2012, **127 (1)**, 29-41.

TOXICOLOGICAL SCIENCES 127(1), 29–41 (2012)
doi:10.1093/toxsci/kfs094
Advance Access publication March 22, 2012

CYP450-Dependent Biotransformation of the Insecticide Fipronil into Fipronil Sulfone Can Mediate Fipronil-Induced Thyroid Disruption in Rats

Béatrice B. Roques,*† Marlène Z. Lacroix,*† Sylvie Puel,*† Véronique Gaynard,*† Nicole Picard-Hagen,†*
Isabelle Jouanin,*† Elisabeth Perdu,*† Pascal G. Martin,*† and Catherine Viguié†*¹

*Institut National de la Recherche Agronomique, UMR1331, Toxalim, Research Centre in Food Toxicology, F-31027 Toulouse, France; and †Université de Toulouse, Institut National Polytechnique, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Ecole d'Ingénieurs de Purpan, Université Paul Sabatier, UMR1331, Toxalim, F-31076 Toulouse, France

¹To whom correspondence should be addressed at INRA, UMR1331, Toxalim, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 23 Chemin des Capelles, 31076 Toulouse cedex 3, France. Fax: +33-5-61-19-39-17. E-mail: c.viguié@envt.fr

Received December 18, 2011; accepted February 17, 2012

In rats, the widely used insecticide fipronil increases the clearance of thyroxine (T₄). This effect is associated with a high plasma concentration of fipronil sulfone, the fipronil main metabolite in several species including rats and humans. In sheep, following fipronil treatment, fipronil sulfone plasma concentration and thyroid disruption are much lower than in rats. We postulated that fipronil biotransformation into fipronil sulfone by hepatic cytochromes P450 (CYP) could act as a potential thyroid disruptor. The aim of this study was to determine if fipronil sulfone treatment could reproduce the fipronil treatment effects on T₄ clearance and CYP induction in rats. Fipronil and fipronil sulfone treatments (3.4 µmol/kg/day *per os*, 14 days) increased total and free T₄ clearances to the same extent in THX + T₃, euthyroid-like rats. Both treatments induced a 2.5-fold increase in *Ugt1a1* and *Sult1b1* messenger RNA (mRNA) expressions and a twofold increase in UGT1A activity suggesting that T₄ elimination was mediated, at least in part, by hepatic uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferases (UGT) and/or sulfotransferases (SULT) induction. Both treatments induced a 10-fold increase in *Cyp3a1* and *Cyp2b2* mRNA expressions concomitant with a threefold increase in CYP3A immunoreactivity and a 1.7-fold increase in antipyrine clearance, a biomarker of CYP3A activity. All these results showed that fipronil sulfone treatment could reproduce the fipronil treatment effects on T₄ clearance and hepatic enzyme induction in rats. The potential of fipronil sulfone to act as a thyroid disruptor is all the more critical because it persists much longer in the organism than fipronil itself.

Key Words: fipronil; fipronil sulfone; thyroid disruption; clearance; metabolism; rat.

Fipronil (5-amino-1-(2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)phenyl)-4-((trifluoromethyl)sulfonyl) pyrazole-3-carbonitrile) is widely used as a phytosanitary product and veterinary insecticide in many countries. It was developed as a substitute for insecticides that are considered more toxic such as lindane and belongs to the

second generation of insecticides acting on the γ-aminobutyric acid receptor chloride channels (Cole *et al.*, 1993).

To date, regulatory toxicological evaluations and experimental investigations have shown that fipronil treatment can act as a thyroid disruptor in rats (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments [AFSSA], 2005; Leghait *et al.*, 2009). However, these studies did not account for species-specific fipronil hepatic metabolism or address the contribution of fipronil metabolites formed *in vivo* to the overall effect of fipronil treatment on thyroid function. Fipronil is readily metabolized into fipronil sulfone in several mammalian species such as rats, humans, livestock species, and dogs (AFSSA, 2005; Mohamed *et al.*, 2004). This main fipronil metabolic pathway is mediated by hepatic cytochromes P450 (CYP) enzymes, and, fipronil, as many other xenobiotics, can lead to increased CYP expression and activity (Das *et al.*, 2006; Leghait *et al.*, 2009).

In rats, *per os* (po) treatment with fipronil is associated with a high plasma concentration of fipronil sulfone concomitant with a marked increase in the clearance of free and total thyroxine (T₄) (Leghait *et al.*, 2009). This results, at least in part, from an increase in the activity of one type of phase II hepatic enzyme potentially involved in T₄ elimination, the uridine 5'-diphospho (UDP)-glucuronosyltransferases (UGT). The fact that thyroid disruption in the rat is associated with high plasma fipronil sulfone concentrations but with very low plasma fipronil concentrations led us to postulate that the metabolite fipronil sulfone might be responsible for the fipronil-induced thyroid disruption rather than fipronil itself. In agreement with this hypothesis, fipronil-induced thyroid disruption is much more limited in sheep, a species in which fipronil treatment results in a much lower plasma fipronil sulfone concentration concomitant with a much higher plasma concentration of fipronil than in the rat (Leghait *et al.*, 2009, 2010). Thus, the biotransformation of fipronil into fipronil

© The Author 2012. Published by Oxford University Press on behalf of the Society of Toxicology. All rights reserved.
For permissions, please email: journals.permissions@oup.com

Downloaded from <http://toxsci.oxfordjournals.org/> by guest on April 18, 2012

sulfone by hepatic CYP enzymes could be a determining factor in fipronil-induced thyroid disruption. Such a hypothesis is supported by *in vitro* data on human hepatocytes indicating that fipronil sulfone is more cytotoxic to hepatocytes and a greater inducer of hepatic enzymes than fipronil itself (Das *et al.*, 2006).

Data in rats and sheep suggest that fipronil sulfone persists much longer in the organism than fipronil itself. For example, in rats, the terminal half-lives were estimated to be 208 and 8.5 h for fipronil sulfone and fipronil, respectively (Mohamed *et al.*, 2004). In sheep, after fipronil treatment, the plasma fipronil sulfone concentration appeared to decrease more slowly than plasma fipronil, so that it remained detectable at high levels long after plasma fipronil became undetectable (Leghait *et al.*, 2010). In humans, data obtained from observations made on acute self-poisoning indicate that fipronil is transformed into fipronil sulfone and disappears rapidly from the blood over the first 15–20 h after ingestion (Mohamed *et al.*, 2004). Because thyroid function is mainly involved in long-term developmental processes, the consequences of an interference with thyroid function on living organisms are more likely to be deleterious if the disruption is sustained for a long period of time. From this standpoint, if the potential of fipronil sulfone as a thyroid disruptor was confirmed, because of its ability to persist much longer in organisms, fipronil sulfone would be of much more concern than fipronil itself.

The goal of this study was to evaluate if treatment with fipronil sulfone, which leads to similar fipronil sulfone internal exposure as with fipronil without a potential effect of the parent fipronil before its biotransformation, has the same effects as fipronil treatment on (1) T_4 clearance and (2) CYP induction. In addition, we sought to gain more insight on which metabolic pathways of thyroid hormones might be triggered by fipronil and/or its metabolite by determining the metabolic profiles of thyroid hormones and quantifying phase I and phase II hepatic enzymes messenger RNA (mRNA) expression and activity.

MATERIALS AND METHODS

Animal Housing, Surgery, Blood, and Tissue Samples

Animal Housing

Experiments were performed on adult female Wistar rats (Wistar Han: WIST Outbred, 225 g body weight) purchased from Harlan (Gannat, France). The rats were housed at two to four per cage at room temperature ($21^\circ\text{C} \pm 1^\circ$) with a reversed 12-h light/dark cycle (lights off at 9:00 A.M.). They were acclimatized for at least 2 weeks before surgery. The rats had free access to food (2016 Teklad Diet; Harlan) and tap water and were weighted twice a week. All animal procedures were carried out in accordance with the accepted standards of humane animal care under the agreement number 31-242 for animal experimentation from the French Ministry of Agriculture.

Surgery

Catheters were surgically inserted into one femoral vein under isoflurane anesthesia (AErrane, Baxter SA, Maurepas, France, 2–2.5% isoflurane in O_2

for serial blood sampling at least 2 days before pharmacokinetic investigations. For experiments 2 and 3 (Fig. 1), the animals had been previously thyroidectomized (THX) 1 week before the beginning of fipronil or fipronil sulfone treatments under isoflurane anesthesia. They were treated with daily triiodothyronine (T_3) sc injections at a dose ($10 \mu\text{g/kg/day}$) calculated to restore T_3 plasma concentrations at steady state close to the physiological ones (Leghait *et al.*, 2009) thus insuring the maintenance of a euthyroid-like physiological status. This model had previously been developed and validated in our laboratory for pharmacokinetic investigations on thyroid hormones in rat (Leghait *et al.*, 2009). Briefly, endogenous T_4 production was suppressed in our model by surgical ablation of the thyroid gland to allow for control of the rate of T_4 entrance into the organism. It is noteworthy that in contrast to immunolabeled thyroxine-based methods (Soldin *et al.*, 2010), our model is the only physiologically relevant one allowing the total T_4 clearance and the free T_4 clearance to be evaluated at the same time *in vivo*. This is important as our previous studies have shown that the clearance of the free T_4 might be an earlier and more sensitive biomarker for metabolism-driven thyroid disruption in different species (Leghait *et al.*, 2009, 2010). Following thyroidectomy, rats were treated with T_3 , the bioactive form of thyroid hormones, to ensure a euthyroid-like state compatible with the maintenance of normal hepatic enzyme activities dependent upon the supply of thyroid hormone to the liver (Liddle *et al.*, 1998; Maamoudi *et al.*, 1997).

Blood and Tissue Sampling

After each blood sample (150–200 μL), a volume of physiological saline equivalent to the collected blood volume was administered, followed by 150 μL of heparinized saline (Heparine choxy, 50 U/mL, Sanofi-Aventis, France). Blood samples were centrifuged at $4000 \times g$ for 15 min at 4°C and the plasma stored at -20°C until assay. For experiments 2 and 3, after the last blood sample, rats were deeply anesthetized with isoflurane, and total blood was collected from the catheter in heparinized tubes for T_3 , fipronil, and fipronil sulfone assays. The livers were infused via the catheter or through the posterior vena cava with sterile isotonic NaCl (B Braun Medical, Boulogne, France; 15 mL/min, 20 mL per liver), rapidly frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until the preparation of hepatic microsomal and cytosolic fractions.

Test Materials and Chemicals

Fipronil (lot B20050318, purity estimated by the supplier: 95.6%) was purchased from 3B Medical Systems Inc. (Libertyville, IL). Fipronil sulfone for experiment 1 (lot 429-35B, purity estimated by the supplier: 99.3%) was purchased from Crescent Chemical (Islandia, NY). Fipronil sulfone for experiments 2 and 3 was obtained by chemical synthesis from fipronil. Briefly, 3-chloroperbenzoic acid (2.024 g, 11.7 mmol; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) was added to fipronil (1.684 g, 3.86 mmol) in dichloromethane (40 mL). The white suspension obtained was stirred at room temperature for 3 days. The organic phase was washed successively with 0.2M sodium hydroxide (20 mL, twice), water (20 mL), and sodium chloride saturated aqueous solution (20 mL). After drying with magnesium sulfate, the solvent was evaporated, and dichloromethane was added to the crude product. Fipronil sulfone precipitated as a white solid (1.245 g, 71% yield). The melting point of the powder obtained was 218°C – 219°C , corresponding to the known fipronil sulfone melting point (219 – 221.5°C , Buntain *et al.*, 1988), whereas the fipronil melting point is 195.5 – 203°C (Connelly, 2001). The purity of fipronil sulfone was evaluated by mass spectrometry (MS). The analysis revealed the parent ion $[\text{M}-\text{H}]^-$ at $m/z = 451$ with its typical isotopic abundance at $[\text{M}-\text{H} + 2]^-$ and $[\text{M}-\text{H} + 4]^-$ linked to the two chlorides. No peak at the m/z transition of 435 could be observed on the spectra confirming that no residual fipronil remained in the preparation.

For *iv* administrations (experiment 1), the fipronil and fipronil sulfone solutions were obtained by dilution of fipronil or fipronil sulfone in an ethanol/pyrogen-free water solution (vol/vol) to produce a final concentration of 2 mg/mL for fipronil and fipronil sulfone. For administrations *po* (experiments 1, 2, and 3),

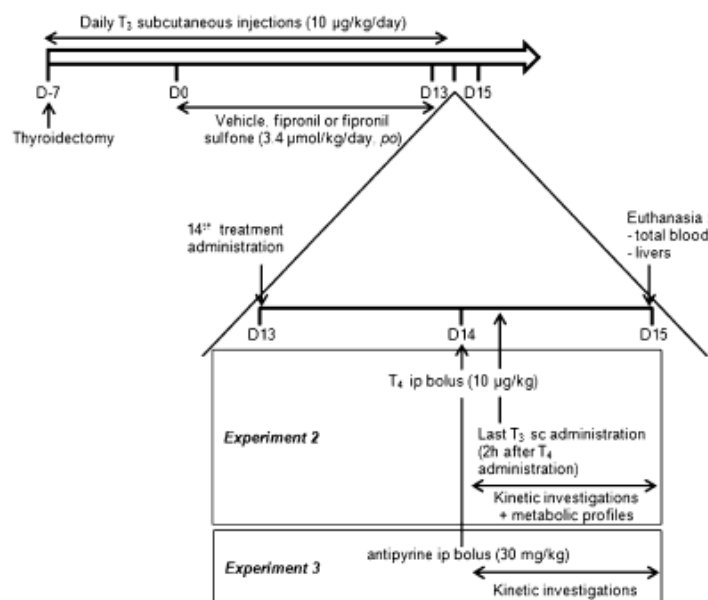


FIG. 1. Experimental designs of experiments 2 (effect of fipronil and fipronil sulfone on T₄ clearance) and 3 (effect of fipronil and fipronil sulfone on CYP induction). Thyroidectomized rats received daily injections of T₃ throughout the experiments. From days 0 to 13, they were treated per os with vehicle, fipronil (3.4 µmol/kg/day), or fipronil sulfone (3.4 µmol/kg/day). At day 14, the rats received an ip bolus of T₄ (10 µg/kg, experiment 2) or antipyrine (30 mg/kg, experiment 3). Total blood and livers were collected after euthanasia to determine T₃ blood concentrations and liver enzyme activity and mRNA expression.

concentrated solutions of fipronil and fipronil sulfone were first prepared in ethanol (0.14 mg/µl). The solutions for administration were obtained by dilution of the concentrated solutions in corn oil to produce final concentrations of 1.50 and 1.55 mg/ml for fipronil and fipronil sulfone, respectively, ensuring that fipronil and fipronil sulfone solutions had the same molar concentration (3.4 µmol/ml). The vehicle in experiments 2 and 3 consisted of a corn oil/ethanol mix. The fipronil and fipronil sulfone solutions were stored protected from light.

For experiment 2, concentrated solutions (1 mg/ml) of T₃ and T₄ (triiodothyronine and L-thyroxine; Sigma-Aldrich) were obtained by dissolving T₃ or T₄ in 0.4M NaOH in 60% ethanol. The final T₃ solution (10 µg/ml) used for sc injections was obtained by a 100-fold dilution of the concentrated solution in saline containing 49.4 mg/ml of sodium bicarbonate. The T₄ solution used for the kinetic experiment (10 µg/ml) was prepared by a 100-fold dilution of the concentrated solution in 10mM PBS pH 7.4 containing 0.1% (wt/vol) bovine serum albumin (BSA). For experiment 3, antipyrine (Sigma-Aldrich) was dissolved in sterile water at a final concentration of 30 mg/ml. The administered volumes were always adjusted to the most recently recorded body weight.

Experimental Schedules

Experiment 1: Determination of the Rates of Absorption of Fipronil and Fipronil Sulfone and of Fipronil Biotransformation into Fipronil Sulfone

To establish the fipronil and fipronil sulfone dosing regimen required to reach similar fipronil sulfone plasma concentrations in experiments 2 and 3 after fipronil or fipronil sulfone treatment po, we determined the fipronil sulfone absorption rate and the rate of fipronil biotransformation into fipronil sulfone.

This experiment was carried out on 16 adult female rats (mean body weights $\pm$ SD = 218 $\pm$ 23 g). The animals were allocated to fipronil- or fipronil sulfone-treated groups (n = 8 each). Three rats of each group received an iv bolus of fipronil (6.9 µmol/kg) or fipronil sulfone (6.6 µmol/kg), and five rats of each group received a po bolus of fipronil (3.4 µmol/kg) or fipronil sulfone (3.4 µmol/kg) through feeding needles. Five rats could not be used until the end of the experiment due to a loss of the catheter function. To monitor the time course of fipronil and fipronil sulfone plasma concentrations, blood (150 µl) was collected in heparinized tubes the day before and 0.08, 0.5, 2, 4, 8, 24, 96, and 144 h after fipronil (n = 2) or fipronil sulfone (n = 2) iv administrations and the day before and 1, 2, 6, 10, 24, 34, 48, 120, 168, and 216 h after fipronil (n = 3) or fipronil sulfone (n = 4) po administrations.

Experiment 2: Effect of Fipronil and Fipronil Sulfone on T₄ Clearance

This experiment was carried out on 39 T₃-treated thyroidectomized (THX + T₃) adult female rats. The animals were allocated to vehicle, fipronil-, or fipronil sulfone-treated groups (n = 13 each) and received a daily po dose of vehicle, fipronil (3.4 µmol/kg/day), or fipronil sulfone (3.4 µmol/kg/day) through gavage tubes for 14 days. This dose of fipronil was within the range of doses that have been shown to be associated to a thyroid disruption in rats in previous studies (AFSSA, 2005; Leghait *et al.*, 2009). Nine rats could not be used in the study because of complication during the surgical procedure or loss of the catheter function. Twenty-four hours after the last administration, all of the rats received an ip bolus of T₄ (10 µg/kg, n = 9, n = 10, and n = 11 for the vehicle control, fipronil-, and fipronil sulfone-treated groups, respectively) leading to physiologically relevant maximal T₄ plasma concentrations in rats (Leghait *et al.*, 2009).

Blood (200 µl) was collected in heparinized tubes the day before and 0.25, 1, 2, 4, 8, 12, and 24 h after T₄ administration to monitor the time course of

plasma T_4 concentrations. Livers were collected 48 h after the last vehicle, fipronil, or fipronil sulfone administration to determine the effect of fipronil and fipronil sulfone on UGT1A and phenol SULT activities and on *Ugt1a1* and *Sult1b1* mRNA expressions. Plasma fipronil and fipronil sulfone concentrations were determined 22.5 ± 0.9 h after the last fipronil or fipronil sulfone administration. Total plasma T_3 concentrations were determined at euthanasia, 23.6 ± 0.5 h after the last T_3 sc injection and 25.7 ± 0.1 h after the T_4 ip administration. The experimental design of experiment 2 is shown in Figure 1.

Experiment 3: Effect of Fipronil and Fipronil Sulfone on CYP Induction

This experiment was carried out on 21 THX + T_3 adult female rats. The animals were allocated to vehicle control, fipronil, or fipronil sulfone-treated groups ($n = 7$ each) and treated as described in experiment 2. Six rats could not be used for the study because of complication during the surgical procedure or loss of the catheter function. Twenty-four hours after the last administration, all of the rats received an ip bolus of anipyrene (30 mg/kg, $n = 5$ for vehicle, $n = 4$ for fipronil-treated, and $n = 6$ for fipronil sulfone-treated groups), an acknowledged surrogate to test the oxidative capacity of the liver *in vivo* (Tanaka *et al.*, 1985) and more specifically the activity of CYP enzymes (Matthew and Houston, 1990).

Blood (200 µL) was collected in heparinized tubes the day before and 0.5, 1, 2, 3, 5, 7, and 9 h after anipyrene administration to monitor the time course of plasma anipyrene concentrations. Livers were collected 48 h after the last vehicle, fipronil, or fipronil sulfone administration to study the effect of fipronil and fipronil sulfone on CYP3A protein expression and on *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, *Cyp2b2*, *Cyp3a1*, and *Cyp3a2* mRNA expressions. Plasma fipronil and fipronil sulfone concentrations were determined 33.4 ± 2.0 h after the last fipronil or fipronil sulfone administration. The experimental design of experiment 3 is shown in Figure 1.

Assays

Fipronil and Fipronil Sulfone Assay

For the iv administration in experiment 1 and the po administrations in experiments 2 and 3, plasma fipronil and fipronil sulfone concentrations were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled with an ultraviolet (UV)/MS detection method as previously described (Lacroix *et al.*, 2010). For the po administration in experiment 1, the extraction method was the same as that above but fipronil and fipronil sulfone plasma concentrations were assayed by liquid chromatography (LC)/MS with an Acquity ultra performance liquid chromatography (UPLC) coupled to a Xevo triple quadrupole mass spectrometer (Waters, Milford, MA). The mean within and between day precision was below 12.0% for both fipronil (three different Quality Control [QC] pools) and fipronil sulfone (five different QC pools) for both methods. The limit of quantification (LOQ) was 2.5 ng/mL for both fipronil and fipronil sulfone. The between-method variability, estimated through the determination of the mean between-method precision of the same QC pools assayed with both methods, was 16.0%.

Subcellular Fractionation and Protein Assays

The preparation of hepatic microsomal fractions was carried out as previously described (Zalko *et al.*, 2006). Supernatants obtained after centrifugation of the S9 fractions were kept as cytosolic fractions. The protein content of the microsomal and the cytosolic fractions was determined in experiment 2 and 3 by the method of Bradford (1976) with BSA as a standard.

Experiment 2: effect of fipronil and fipronil sulfone on T_4 clearance.

Thyroid Hormone Assays. Total and free plasma T_4 (TT₄ and FT₄) and total plasma T_3 (TT₃) concentrations were determined using radioimmunoassay kits from Siemens (Coat-a-count kits, Siemens Healthcare Diagnostics, Los Angeles, CA). All assays were performed according to the manufacturer's instructions. The mean intra-assay coefficient of variation for three QC pools was 8.1 and 11.6% for TT₄ and FT₄, respectively, and the mean inter-assay

coefficient of variation for these three QC pools was 9.4 and 11.7% for TT₄ and FT₄, respectively. All the T_3 samples were quantified in the same run and the mean intra-assay coefficient of variation for three QC pools was 10.4%. The limits of quantification for the total T_4 and total T_3 assays were validated at 5 and 0.1 ng/mL, respectively. The limit of detection of the free T_4 assay was set at the lowest value of the standard curve, i.e., 1 pg/mL.

Thyroid Hormone Metabolic Profiles. In an attempt to determine if metabolic pathways other than conjugation might have been involved in the increased T_4 clearance, we characterized the profile of thyroid hormone metabolites in plasma during the T_4 kinetic experiment. The remaining plasma samples from experiment 2 were pooled by treatment to obtain two different pools for each time point. T_4 , T_3 , T_2 (diiodothyronine), and rT_3 (reverse triiodothyronine) were assayed by LC/MS with an Acquity UPLC coupled to a Xevo triple quadrupole mass spectrometer (Waters). Thyroid hormones samples spiked with T_4 -d₅ as an internal standard were purified by solid-phase extraction with Strata X-C cartridges (Phenomenex, LePecq, France). The extracted samples were separated on an Acquity BEH RP18 column (2.1 × 100 mm, 1.7 µm; Waters) with an acidified (0.05% formic acid) H₂O/ACN gradient elution. Samples were ionized in positive electrospray ionization mode (ESI⁺) and detected with the following multiple reaction monitoring transitions: T_4 m/z 778 < 605; T_3 and rT_3 m/z 652 < 606; T_2 m/z 526 < 480; and T_4 -d₅ m/z 783 < 201. The calibration curves ranged from 5 to 100 ng/mL for T_4 , from 0.2 to 100 ng/mL for rT_3 and T_3 and from 1 to 100 ng/mL for T_2 . The selectivity of the method for the T_2 isomers 3,3'-diiodothyronine and 3',5'-diiodothyronine was not evaluated.

Determination of *Ugt1a1* and *Sult1b1* mRNA Expression by RT-qPCR. In the liver of female rats, UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) and sulfotransferase 1B1 (SULT1B1) are key isoenzymes for the conjugation of T_4 (Kester *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2005). We, thus, focused the investigation of mRNA expression primarily on these two enzymes. Total hepatic RNAs were extracted with TRIzol reagent (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) according to the manufacturer's protocol, and 2 µg were reverse transcribed using SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen). RT-qPCR was performed using the SYBR Green TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Fluorescence was monitored and analyzed on a 7300 Real-Time PCR detection system instrument (Applied Biosystems). RT-qPCR data were normalized by TATA box-binding protein (*Tbp*) mRNA levels. Results are expressed as $\frac{2^{-(C_{T, \text{target}} - C_{T, \text{ref}})}}{\text{mean}(\frac{2^{-(C_{T, \text{target}} - C_{T, \text{ref}})}}{\text{total group}})}$, where C_t corresponds to the number of cycles needed to generate a fluorescent signal above a predefined threshold. All the primers used (Table 1) were validated for RT-qPCR efficiency.

UGT1A Activity Toward 4-Nitrophenol. To verify that the increase in *Ugt* mRNA expression correlated with an increase in UGT enzymes activity, we determined UGT1A activity toward 4-nitrophenol. This enzyme activity can be considered as a relevant index for the capacity of the liver to glucuronidate thyroid hormones. Indeed, UGT isoforms involved in T_4 glucuronidation are the bilirubin and phenol UGT1A (Visser *et al.*, 1993), which catalyze the conjugation of simple phenols like 4-nitrophenol (Peters *et al.*, 2003). UGT activity toward 4-nitrophenol was assayed by an optimization of the method of Burchell and Weatherill (1981) on microsomal fractions as previously described (Leghait *et al.*, 2009) with a substrate (4-nitrophenol) concentration of 4 mM.

Phenol SULT Activity Toward 2-Naphthol. To verify whether the increase in *Sult* mRNA expression correlated with an increase in the activity of SULT enzymes, we determined phenol SULT activity toward 2-naphthol. This enzyme activity can be considered as a relevant index for the capacity of the liver to sulfonate thyroid hormones as both the sulfonconjugation of thyroid hormones and 2-naphthol are carried out by phenol sulfotransferases (Gamage *et al.*, 2006). SULT activity toward 2-naphthol was assayed by optimizing the method of Sekura *et al.* (1981) as modified by Sheng *et al.* (2001). Briefly, the 2-naphthol substrate (0.25 mM) and the 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate cofactor (0.2 mM) were incubated at 37°C with 220 µg of cytosolic proteins in a sodium acetate buffer (0.5 M, pH 5.5). The reaction was stopped after 10 min with sulfuric acid containing methylene blue (final concentrations in the mix of

TABLE 1
Oligonucleotide Sequences for RT-qPCR

Gene	NCBI RefSeq	Forward primer (5'–3')	Reverse primer (5'–3')
<i>Tbp</i>	NM_001004198	CCACACCAAGCCCTCTGAGAGC	AGCCAAGATTCAACGGTGGAT
<i>Ugt1a1</i>	NM_012683	CTTCAGAAAAAGCCCTATCCCA	CCAAAGAGAAAAACACGATGC
<i>Sult1b1</i>	NM_022513	GAACAAATGTCTCTGGAGCAAG	TGATGGAGTTTCTTCAAGAGTTCAA
<i>Cyp1a1</i>	NM_012540	CAGTCTCTCTCAGACGCAAA	AGGCTGGGAATCCATACACAGA
<i>Cyp1a2</i>	NM_012541	TGAGGACTCAGTCTCTCTCTCA	GGACAACTTGTAAAGGATCAGCTCTCT
<i>Cyp2b2</i>	XM_001062335	CTCCGCTATGGTTTCTCTGCT	AGGGATGGTGGCCGTGTGA
<i>Cyp3a1</i>	NM_013105	TTCTGCAAAACTCTCTCTTCAG	CTTTAGAATAATGGGTTTGTGGTTG
<i>Cyp3a2</i>	NM_153312	TTCTCTCTCCAGCCTTGCA	CAATAAAATTCTTGAGGGAAAGTCAG

0.1mM and 0.15mM, respectively). Methylene blue forms paired ions with the 2-naphthylsulfate formed by the sulfoconjugation reaction. The resulting sulfuric acid ester was extracted with chloroform and was quantified by reading the absorbance at 651 nm. The SULT activity was calculated as the nanomoles of 2-naphthylsulfate formed per time unit and milligram of hepatic cytosolic proteins.

Experiment 3: Effect of fipronil and fipronil sulfone on CYP induction. Antipyrine Assay. Plasma antipyrine concentrations were determined by HPLC coupled with a UV detection method as previously described (Leghait *et al.*, 2009). The mean within-day precision for three QC pools was 4.3%, and the mean between-day precision for these three QC pools was 6.4%. The LOQ was validated at 0.3 µg/mL.

Determination of *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, *Cyp2b2*, *Cyp3a1*, and *Cyp3a2* mRNA Expression by RT-qPCR. Human CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, and CYP3A4 are responsible for fipronil metabolism (Das *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2004) and/or involved in antipyrine metabolism (Engel *et al.*, 1996). Thus, we determined the mRNA expression of the corresponding rat orthologs *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, *Cyp2b2*, *Cyp3a1*, and *Cyp3a2* by RT-qPCR in vehicle, fipronil-, and fipronil sulfone-treated groups. RT-qPCR was performed on those mRNA as described above. All the primers used (Table 1) were validated for RT-qPCR efficiency.

CYP3A Protein Expression by Western Blot. As CYP3A4 is the predominant isoform responsible for the S-oxidation of fipronil in humans (Tang *et al.*, 2004), we determined if the increase in mRNA expression as a result of fipronil and/or fipronil sulfone treatment was associated with increased protein expression of the equivalent orthologs in rats. Western blot analyses were done with 10 µg of heat-denatured microsomal proteins. The electrophoresis was run on precast gels (80V, 30 min; 150V, 90 min), and the proteins were transferred onto polyvinylidene fluoride membranes (120V, 60 min). After blocking for nonspecific binding (120 min), the membranes were incubated for 60 min with a mouse monoclonal anti-human CYP3A primary antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc, Heidelberg, Germany). After washing, the membranes were incubated for 40 min with a goat anti-mouse secondary antibody coupled to an infrared fluorophore (goat anti-mouse 770 CW IgG, Biotium, Interchim, Mondonville, France). After washing, the staining was quantified with an infrared imaging system (Olympeo infrared imaging system, Licor Biosciences, Les Ulis, France).

A molecular weight marker and three reference pools loaded at 2, 6, or 12 µg of proteins were repeated on all the gels. Each gel included 10 µg of microsomal proteins from two different animals of each treatment group. A calibration curve of the staining intensity versus quantity of protein was obtained through quantification of the reference pool signals and used to calculate the theoretical signal for 10 µg of protein. This value was then used to normalize the signal intensity between membranes. The relative intensity of the signal for each sample was defined as the ratio of the observed signal intensity to the calculated 10 µg theoretical signal and was expressed per gram of fresh tissue.

The specificity of the primary antibody directed to human CYP3A for rat CYP3A was checked by preincubations of the antibody mix with rat CYP3A1 and rat CYP3A2 Supersomes at different concentrations (2–80 µg; BD Biosciences, Le Pont-De-Clair, France). Preincubation with either supersomes for 5 h resulted in a marked supersome concentration-dependent decrease of immunoreactivity in microsomal fractions thus attesting that the signal obtained in our microsomal pool was specific for the rat CYP3A family. The specificity of the secondary antibody was checked by omitting the primary antibody and verifying that no signal above the background could be detected.

Pharmacokinetic Analysis

The pharmacokinetic analyses for experiment 1 were performed by noncompartmental analysis. AUCs (Areas under the plasma concentration time curves) for fipronil and fipronil sulfone after fipronil or fipronil sulfone iv or po administrations were determined using the log-linear trapezoidal rule. The fraction f_{po} of fipronil that was not transformed by first-pass metabolism into fipronil sulfone was calculated according to $f_{po} = \frac{AUC_{po}^{fipronil} / AUC_{po}^{fipronil sulfone}}{AUC_{po}^{fipronil} / AUC_{po}^{fipronil} + AUC_{po}^{fipronil sulfone} / AUC_{po}^{fipronil sulfone}}$, where AUCs for fipronil and fipronil sulfone were determined after fipronil iv or po administrations (Weiss, 1988). $(1 - f_{po})$ characterized the degree of first-pass formation of the metabolite as the liver is the main organ involved in fipronil elimination (AFSSA, 2005), assuming that $f_{po} = F_{Ht}$ (fraction of fipronil that escapes a single passage through the liver) and $(1 - f_{po}) = E_{Ht}$ (hepatic extraction ratio). E_{Ht} is a good estimator of fipronil biotransformation into fipronil sulfone. The fractions of fipronil or fipronil sulfone absorbed, $f_{ip,abs}$ and $f_{sulf,abs}$ were defined as $f_{abs} = \frac{AUC_{po}^{fipronil} / AUC_{po}^{fipronil}}{AUC_{po}^{fipronil} / AUC_{po}^{fipronil} + AUC_{po}^{fipronil sulfone} / AUC_{po}^{fipronil sulfone}} \times \frac{Dose_{po}}{Dose_{iv}}$, where AUCs for fipronil sulfone were determined after fipronil iv or po administrations to estimate $f_{ip,abs}$ and after fipronil sulfone iv or po administrations to estimate $f_{sulf,abs}$ (Weiss, 1990).

The pharmacokinetic analyses for experiment 2 and 3 were performed by least-squares regression analysis using WinNonlin software as previously described (Leghait *et al.*, 2009). The time course of plasma antipyrine and total and free T_4 concentrations were fitted using a biexponential equation corresponding to a one-compartment model with a first-order absorption phase. The data were weighted by the inverse of the fitted values for free T_4 , but no weighting was applied to the total T_4 and antipyrine data. The terminal half-life ($t_{1/2}$), the time (T_{max}) at the maximal concentration (C_{max}), and the apparent clearance were determined.

Statistical Analysis

The effect of the treatments on the mean plasma T_3 concentrations, TT_4 , FT_4 and antipyrine PK parameters, UGT and SULT activities, CYP3A protein expression, *Ugt*, *Sult*, and *Cyp* mRNA expressions, and animal and liver

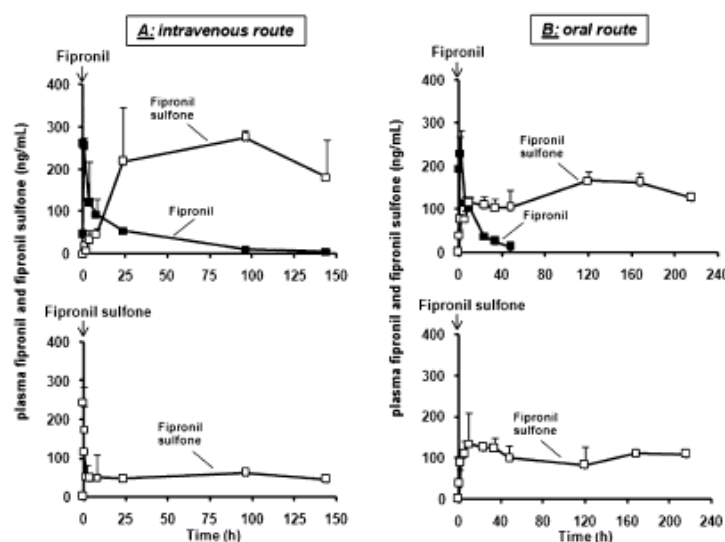


FIG. 2. Time course of mean ($\pm$ SD) plasma fipronil (●) and fipronil sulfone (□) concentrations after an iv (A) or a po (B) bolus of fipronil (top graphs) or fipronil sulfone (bottom graphs). Fipronil and fipronil sulfone plasma concentrations were measured in blood samples collected the day before and 0.08, 0.25, 0.5, 2, 4, 8, 24, 96, and 144 h after fipronil or fipronil sulfone iv administrations and the day before and 1, 2, 6, 10, 24, 34, 48, 120, 168, and 216 h after fipronil or fipronil sulfone po administrations.

weights was analyzed using a one-way ANOVA with treatment (vehicle control, fipronil, fipronil sulfone) as fixed effect factor, followed by a Bonferroni post hoc comparison. These analyses were computed using R software (R 2.6.2, R Development Core Team, Vienna, Austria).

RESULTS

Experiment 1: Determination of Rates of Fipronil and Fipronil Sulfone Absorption and of Fipronil Biotransformation into Fipronil Sulfone

Figure 2 shows the time course of the mean ($\pm$ SD) fipronil and fipronil sulfone plasma concentrations after fipronil or fipronil sulfone iv administration (Fig. 2A) and fipronil or fipronil sulfone po administration (Fig. 2B). The fraction of fipronil that escapes a liver first-pass effect f_{po} was 0.25 and the hepatic extraction ratio E_H was estimated at 0.75 indicating that 75% of fipronil was biotransformed into fipronil sulfone. The absorption coefficients were similar for fipronil and fipronil sulfone ($f_{abs} = 0.98$ and 0.96 for fipronil and fipronil sulfone, respectively), and both molecules were well absorbed after a po administration. From those results, it was clear that fipronil was highly converted into fipronil sulfone after a fipronil po administration and that the absorption rate after the po route was similar for both molecules. These results clearly indicate that equimolar treatments with either fipronil or fipronil sulfone are likely to lead to similar fipronil sulfone concentrations at steady state.

Experiments 2 and 3: Plasma Fipronil and Fipronil Sulfone Concentrations at the Time of the T_4 or Antipyrene Kinetic Investigations

The plasma fipronil and fipronil sulfone concentrations observed at the end of the two experiments are listed in Table 2. The fipronil levels were below the LOQ of the assay in the fipronil-treated groups. The ratio of fipronil sulfone to fipronil plasma concentrations could be roughly estimated by the ratio of fipronil sulfone plasma concentration to the fipronil LOQ of the assay indicating that it was at least 400 for experiments 2 and 3. As expected from the results of experiment 1, plasma fipronil sulfone concentrations were similar in the fipronil- and in the fipronil sulfone-treated groups for both experiments.

Experiment 2: Effect of Fipronil and Fipronil Sulfone on T_4 Clearance

Characterization of the euthyroid-like state. The mean ($\pm$ SD) total plasma T_3 concentrations were 0.51 ± 0.16 , 0.30 ± 0.07 , and 0.30 ± 0.13 ng/ml for the vehicle, fipronil-, and fipronil sulfone-treated groups, respectively, 23.6 ± 0.5 h after the last T_3 sc injection and 25.7 ± 0.1 h after the T_4 ip administration. All these concentrations were within the physiological range of total T_3 concentrations in rats (Döhler *et al.*, 1979). However, a significant treatment effect ($p < 0.05$)

TABLE 2
Mean ($\pm$ SD) Plasma Fipronil and Fipronil Sulfone Concentrations in Fipronil-Treated ($3.4 \mu\text{mol/kg/day}$ *per os* for 14 days) or Fipronil Sulfone-Treated ($3.4 \mu\text{mol/kg/day}$ *per os* for 14 days) THX + T_3 Euthyroid-Like Rats

	Experiment 2, 22.5 ± 0.9 h after the last fipronil or fipronil sulfone administration, $n = 21$		Experiment 3, 33.4 ± 0.2 h after the last fipronil or fipronil sulfone administration, $n = 10$	
	Fipronil group, $n = 10$	Sulfone group, $n = 11$	Fipronil group, $n = 4$	Sulfone group, $n = 6$
Plasma fipronil (ng/ml)	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Plasma fipronil sulfone (ng/ml)	1502 ± 394	1680 ± 557	1214 ± 547	1285 ± 244

Note. LOQ (2.5 ng/ml for fipronil).

was observed. Fipronil and fipronil sulfone treatments produced a significant 1.7-fold decrease in total plasma T_3 concentrations ($p < 0.05$), and there was no significant difference in total plasma T_3 concentrations between the two treated groups ($p > 0.05$).

Effect of treatments on body and liver weights. The mean body weights ($\pm$ SD) were similar at the beginning (236 ± 13 , 237 ± 11 , and 240 ± 12 g) and at the end (239 ± 20 , 240 ± 9 , and 246 ± 10 g) of the experiment for the vehicle, fipronil-, and fipronil sulfone-treated groups, respectively. The mean ($\pm$ SD) liver weights expressed as a percentage of body weight were $3.18 \pm 0.29\%$, $4.18 \pm 0.54\%$, and $3.83 \pm 0.55\%$ at the end of the experiment for the vehicle, fipronil-, and fipronil sulfone-treated groups, respectively, indicating a significant 31.5% and 20.4% increase in liver weight in the fipronil- and fipronil sulfone-treated groups ($p < 0.01$).

Effect of treatments on total and free T_4 pharmacokinetic parameters. T_4 was undetectable in blood samples collected before T_4 administration, confirming the T_4 -free status of the THX + T_3 rats. Figure 3 shows the time course of the mean ($\pm$ SD) total (Fig. 3A, left) and free (Fig. 3B, left) plasma T_4 concentrations and the resulting apparent clearances for total (Fig. 3A, right) and free (Fig. 3B, right) T_4 . The mean total and free plasma T_4 concentrations were higher in the vehicle control group than in the treated groups at all time points. The maximum total T_4 concentration for the control group was within the physiological range for rats (Topo *et al.*, 2010). The apparent clearances of total and free T_4 were about 2.5- and 2.8-fold higher in the two treated groups than in the vehicle group. The other total and free T_4 pharmacokinetic parameters are presented in Table 3. There was no significant difference in TT_4 and FT_4 pharmacokinetic parameters between the fipronil- and fipronil sulfone-treated groups ($p > 0.05$). For total T_4 , the

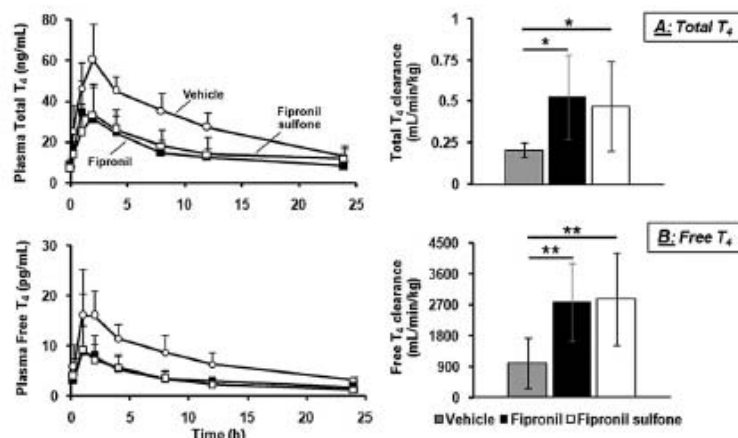


FIG. 3. Time course of mean ($\pm$ SD) plasma total T_4 (A, left) and free T_4 (B, left) concentrations following an ip T_4 bolus ($10 \mu\text{g/kg}$) to vehicle ($n = 9$, $\circ$), fipronil-treated ($3.4 \mu\text{mol/kg/day}$ *per os* for 14 days, $n = 10$, $\blacksquare$), and fipronil sulfone-treated ($3.4 \mu\text{mol/kg/day}$ *per os* for 14 days, $n = 11$, $\square$) THX + T_3 euthyroid-like rats. Total and free T_4 concentrations were measured in blood samples collected before and at 0.25, 1, 2, 4, 8, 12, and 24 h after the T_4 bolus. The bar graphs represent mean ($\pm$ SD) total T_4 (A, right) and free T_4 (B, right) clearances in vehicle control (gray bars), fipronil-treated (black bars), and fipronil sulfone-treated (white bars) groups. Significantly different from control: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

TABLE 3

Mean ($\pm$ SD) Total and Free T_4 Pharmacokinetic Parameters in Vehicle Control ($n = 9$), Fipronil-Treated ($3.4 \mu\text{mol/kg/day per os}$ for 14 days, $n = 10$), or Fipronil Sulfone-Treated ($3.4 \mu\text{mol/kg/day per os}$ for 14 days, $n = 11$) THX + T_3 Euthyroid-Like Rats

	Vehicle, ($n = 9$)	Fipronil, ($n = 10$)	Fipronil sulfone, ($n = 11$)
Total T_4			
$t_{1/2}$ (h)	9.5 ± 4.1	8.0 ± 5.4	8.6 ± 4.5
T_{max} (h)	1.8 ± 0.5	1.6 ± 0.4	2.0 ± 1.0
C_{max} (ng/ml)	56.5 ± 12.6	$32.1 \pm 13.8^*$	$32.3 \pm 13.4^*$
Free T_4			
$t_{1/2}$ (h)	8.1 ± 3.5	$4.7 \pm 2.0^*$	$4.5 \pm 1.9^*$
T_{max} (h)	2.0 ± 0.5	1.8 ± 0.4	2.0 ± 0.9
C_{max} (pg/ml)	15.5 ± 5.3	$7.9 \pm 2.3^*$	$8.7 \pm 5.6^*$

Notes. Twenty-four hours after the last vehicle, fipronil, or fipronil sulfone administration, total and free T_4 were assayed in blood samples collected before and at 0.25, 1, 2, 4, 8, 12, and 24 h after a T_4 ip administration ($10 \mu\text{g/kg}$). Total and free T_4 parameters were calculated using a one-compartment model for extravascular administration with first-order absorption and elimination phases. Significantly different from control: $^*p < 0.05$.

C_{max} was significantly lower in the fipronil- and fipronil sulfone-treated groups than in the vehicle group, while the half-life and T_{max} were unaffected by the treatment. For free T_4 , the C_{max} and T_4 half-life were significantly lower in fipronil- and fipronil sulfone-treated groups than in the vehicle control group, while the T_{max} was unaffected by the treatment.

Effect of treatments on T_4 metabolic profiles. Figure 4 shows the time course of the mean ($\pm$ SD) T_4 (A), T_3 (B), and T_2 (C) plasma concentrations in plasma pooled by treatment (two different pools for each time point) following T_4 administration. rT_3 plasma concentrations were below the LOQ of the assay. Overall, those results on total T_4 concentrations were consistent with results obtained by assaying T_4 in individual rats by radioimmunoassay. T_4 plasma concentrations for the vehicle pool were higher than for fipronil- and fipronil sulfone-treated pools at all time points. T_3 plasma concentrations rose well above the physiological range just after the T_3 sc injection but decreased rapidly to physiological levels for all pools. However, plasma T_3 concentrations appeared to be higher for the vehicle pool for each time point. The plasma concentrations of T_2 did not appear to vary over time even after the T_4 or T_3 administration. Interestingly, plasma T_2 concentrations were higher for the vehicle pool than for the fipronil- and fipronil sulfone-treated ones at all time points.

Effect of treatments on *Ugt1a1* and *Sult1b1* mRNA expressions and on UGT1A and phenol SULT activities. The bar graphs on the left of Figure 5 represent the mRNA expressions for *Ugt1a1* (Fig. 5A, left) and *Sult1b1* (Fig. 5B,

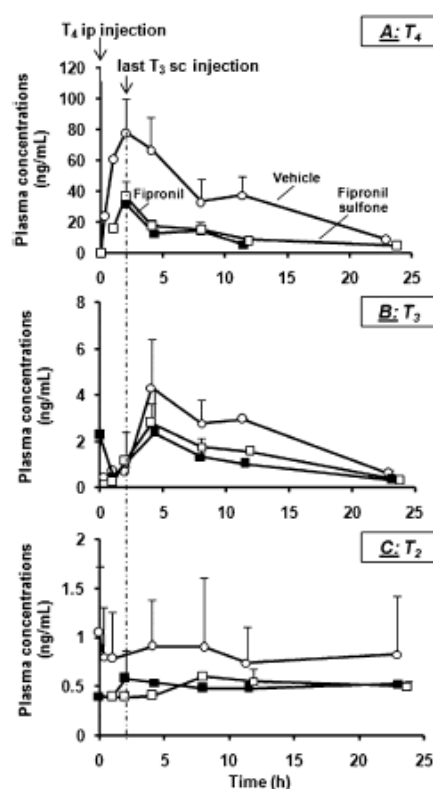


FIG. 4. Time course of mean ($\pm$ SD) plasma T_4 (A), T_3 (B), and T_2 (C) concentrations following an ip T_4 bolus ($10 \mu\text{g/kg}$) to vehicle control (○), fipronil-treated ($3.4 \mu\text{mol/kg/day per os}$ for 14 days, ●), and fipronil sulfone-treated ($3.4 \mu\text{mol/kg/day per os}$ for 14 days, □) THX + T_3 euthyroid-like rats. Blood samples collected for T_4 kinetic investigations were pooled by treatment to obtain two pools for each treatment ($n = 4$ to 6 animals by pool) and time point (before and at 0.25, 1, 2, 4, 8, 12 and 24 h after the T_4 bolus). Values are mean ($\pm$ SD) of plasma concentrations of the two pools for each point.

left). Significant 3.1- and 4-fold increases were recorded in *Ugt1a1* mRNA expression in the fipronil- and fipronil sulfone-treated groups, respectively ($p < 0.01$). Similarly, *Sult1b1* mRNA expression showed significant 2.5- and 2.9-fold increases in the fipronil- and fipronil sulfone-treated groups, respectively ($p < 0.01$).

The bar graphs on the right of Figure 5 show the mean ($\pm$ SD) UGT1A activity toward 4-nitrophenol (Fig. 5A, right) and the mean ($\pm$ SD) phenol SULT activity toward 2-naphthol (Fig. 5B, right). UGT1A activity was significantly higher in the fipronil- and fipronil sulfone-treated groups ($p < 0.01$) with a 1.9- and 2.1-fold increases as compared with the vehicle group. Surprisingly, none of the treatments had an effect on SULT activity toward 2-naphthol ($p > 0.05$).

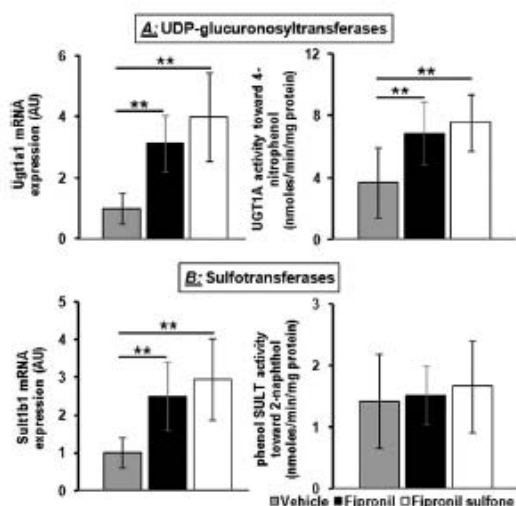


FIG. 5. Mean ($\pm$ SD) mRNA expression (left) of *Ugt1a* (A) and *Sult1b1* (B) and hepatic activities (right) of microsomal UGT1A (A) and cytosolic phenol SULT (B) in vehicle ($n = 9$, gray bars), fipronil-treated ($3.4 \mu\text{mol/kg/day per os}$ for 14 days, $n = 10$, black bars), or fipronil sulfone-treated ($3.4 \mu\text{mol/kg/day per os}$ for 14 days, $n = 11$, white bars) THX + T_3 euthyroid-like rats. Significantly different from control: ** $p < 0.01$.

Experiment 3: Effect of Fipronil and Fipronil Sulfone on CYP Induction

Effect of treatments on body and liver weights. The mean body weights ($\pm$ SD) of the rats were similar at the beginning (237 ± 6 , 241 ± 12 , and 243 ± 17 g) and at the end (243 ± 9 , 244 ± 9 , and 244 ± 18 g) of the experiment for the vehicle, fipronil-, and fipronil sulfone-treated groups, respectively. The mean ($\pm$ SD) liver weights expressed as a percentage of body weight were $3.41 \pm 0.35\%$, $3.89 \pm 0.40\%$, and $3.67 \pm 0.22\%$ at the end of the experiment for the vehicle, fipronil-, and fipronil sulfone-treated groups, respectively, and did not differ significantly between groups ($p = 0.11$).

Effect of treatments on antipyrine pharmacokinetic parameters. Figure 6 (left) shows the time course of the mean ($\pm$ SD) plasma antipyrine concentrations in vehicle, fipronil-, and fipronil sulfone-treated groups after antipyrine ip administration. The mean plasma antipyrine concentrations in the vehicle group were higher than in the treated groups at all time points. The treatment significantly affected apparent antipyrine clearance (Fig. 6, right), which was 1.7-fold higher in the two treated groups ($p < 0.01$). The other antipyrine pharmacokinetic parameters are given in Table 4. A significant 1.7-fold decrease in antipyrine half-life was observed in the fipronil- and fipronil sulfone-treated groups ($p < 0.01$). Whatever the parameter, there was no difference between the two treated groups ($p > 0.05$).

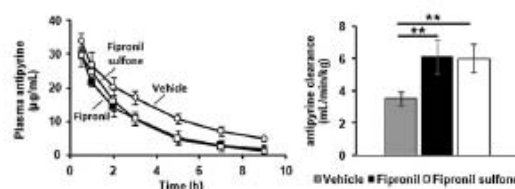


FIG. 6. Time course of mean ($\pm$ SD) plasma antipyrine (left) concentrations following an ip antipyrine bolus (30 mg/kg) to vehicle ($n = 5$, $\square$), fipronil-treated ($3.4 \mu\text{mol/kg/day per os}$ for 14 days, $n = 4$, $\blacksquare$), and fipronil sulfone-treated ($3.4 \mu\text{mol/kg/day per os}$ for 14 days, $n = 6$, $\square$) THX + T_3 euthyroid-like rats. Antipyrine was measured in blood samples collected at 0.5, 1, 2, 3, 5, 7, and 9 h after the antipyrine bolus. The bar graphs represent mean ($\pm$ SD) antipyrine clearance (right) in vehicle control (gray bars), fipronil-treated (black bars), and fipronil sulfone-treated (white bars) groups. Significantly different from control: ** $p < 0.01$.

Effect of treatments on *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, *Cyp2b2*, *Cyp3a1*, and *Cyp3a2* mRNA expressions and on CYP3A protein expression. *Cyp1a1* (A), *Cyp1a2* (B), *Cyp2b2* (C), *Cyp3a1* (D), and *Cyp3a2* (E) mRNA expressions are shown in Figure 7. The fipronil and fipronil sulfone treatments induced a significant increase in *Cyp3a1* and *Cyp2b2* mRNA expression ($p < 0.01$) as compared with the vehicle group. *Cyp3a1* mRNA expression was 22.1- and 18.7-fold higher and *Cyp2b2* mRNA expression was 10.1- and 7.0-fold higher in the fipronil- and fipronil sulfone-treated groups, respectively. The treatments had no significant effect on the expression of *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, and *Cyp3a2* mRNA ($p > 0.05$).

Figure 8A shows a representative example of a Western blot with labeling of CYP3A immunoreactivity for one representative rat of each group from experiment 3. One immunoreactive band was identified at about 52 kDa as a CYP3A immunoreactive band. The bar graphs of the Figure 8B show the mean ($\pm$ SD) relative intensity of the CYP immunoreactive

TABLE 4

Mean ($\pm$ SD) Antipyrine Pharmacokinetic Parameters in Vehicle Control ($n = 5$), Fipronil-Treated ($3.4 \mu\text{mol/kg/day per os}$ for 14 days, $n = 4$), or Fipronil Sulfone-Treated ($3.4 \mu\text{mol/kg/day per os}$ for 14 days, $n = 6$) THX + T_3 Euthyroid-Like Rats

	Vehicle, ($n = 5$)	Fipronil, ($n = 4$)	Fipronil sulfone, ($n = 6$)
$t_{1/2}$ (h)	2.8 ± 0.4	1.7 ± 0.4 **	1.6 ± 0.2 **
T_{max} (h)	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.2
C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	32.9 ± 3.9	31.4 ± 2.7	31.0 ± 3.7

Notes. Twenty-four hours after the last vehicle, fipronil, or fipronil sulfone administration, antipyrine was assayed in blood samples collected at 0.5, 1, 2, 3, 5, 7, and 9 h after an antipyrine ip administration (30 mg/kg). Antipyrine parameters were estimated using a one-compartment model for extravascular administration with first-order absorption and elimination phases. Significantly different from control: ** $p < 0.01$.

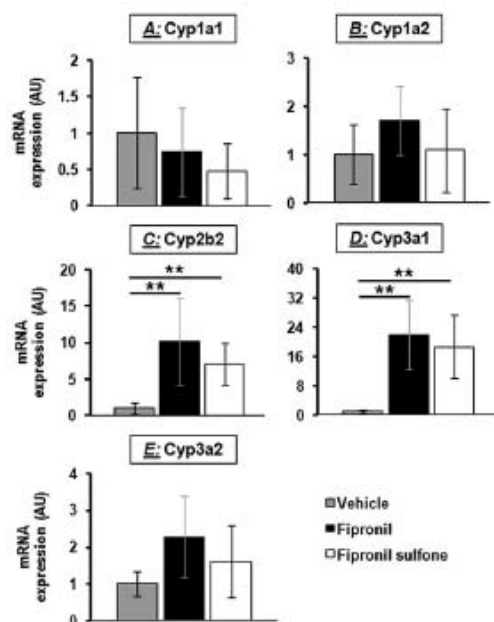


FIG. 7. Mean ($\pm$ SD) mRNA expressions of *Cyp1a1* (A), *Cyp1a2* (B), *Cyp2b2* (C), *Cyp3a1* (D), and *Cyp3a2* (E) in vehicle control ($n = 5$, gray bars), fipronil-treated ($3.4 \mu\text{mol/kg/day per os}$ for 14 days, $n = 4$, black bars), or fipronil sulfone-treated ($3.4 \mu\text{mol/kg/day per os}$ for 14 days, $n = 6$, white bars) THX + T_3 euthyroid-like rats. Significantly different from control: ** $p < 0.01$.

band in the three groups. A significant effect of treatment ($p < 0.05$) was observed, resulting in a significant 4.2- and 4.5-fold increase in CYP3A expression in the fipronil- and fipronil sulfone-treated groups, respectively ($p < 0.05$).

DISCUSSION

In agreement with our previous results (Leghait *et al.*, 2009), the current study demonstrates that fipronil treatment leads to an increase in free and total T_4 clearances in THX + T_3 euthyroid-like rats. In Leghait's (2009) experiment, the thyroid disruption in fipronil-treated rats could have resulted from either a direct action of fipronil before its hepatic biotransformation into fipronil sulfone or from an action of fipronil sulfone, which persists much longer in the organism than fipronil itself. To determine if fipronil sulfone could be responsible for thyroid disruption, we chose in the current study to compare the thyroid-disrupting effects of fipronil and fipronil sulfone treatments that gave similar plasma fipronil sulfone concentrations. In order to establish the dosing regimen, we first carried out pharmacokinetic investigations

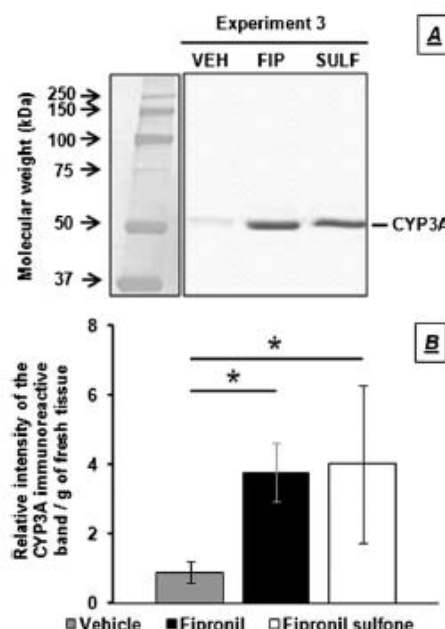


FIG. 8. Western blot (A) with labeling for the quantification of CYP3A protein expression for one representative THX + T_3 euthyroid-like rat of vehicle (VEH), fipronil-treated (FIP), or fipronil sulfone-treated (SULF) groups from experiment 3. Immunoreactivity was quantified with an infrared imaging system. The bar graphs represent mean ($\pm$ SD) CYP3A immunoreactivity (B) in the vehicle control (gray bars, $n = 5$), fipronil-treated (black bars, $n = 4$), and fipronil sulfone-treated (white bars, $n = 6$) groups. CYP3A immunoreactivity was normalized according to a theoretical value for a reference pool. Significantly different from control: * $p < 0.05$.

of both molecules given by the iv and po routes. For the first time, a precise determination of the rate of fipronil biotransformation into fipronil sulfone and of the absorption of fipronil and fipronil sulfone were established. From our results, it was clear that (1) hepatic first-pass metabolism of fipronil is very important after the po route and (2) fipronil is largely transformed into fipronil sulfone for both routes of administration. This indicated that equimolar fipronil and fipronil sulfone dosing regimen should result in similar fipronil sulfone concentrations, which led us to use this equimolar dosing regimen in our main experiments.

As results from our laboratory and from non-peer-reviewed toxicological evaluations (AFSSA, 2005; Leghait *et al.*, 2009) suggested that conjugation mechanisms associated with biliary clearance were primarily involved in fipronil-induced thyroid disruption in rats, we first studied T_4 conjugation pathways. We demonstrated that the mRNA expression of *Ugt1a1* was increased by both fipronil and fipronil sulfone treatments suggesting that UGT1A1 might be involved in increasing T_4

elimination. This hypothesis was strengthened by the fact that both treatments increased not only *Ugt1a1* gene expression but also UGT1A activity.

Sult1b1 mRNA expression was increased by fipronil and fipronil sulfone treatments but none of the two treatments had a significant effect on phenol SULT activity toward 2-naphthol. This apparent discrepancy could be explained by the fact that measurement of phenol SULT activity might result from the activity of several other SULT1 isoforms. Indeed, SULT1A1, SULT1A3 and SULT1C2 that are less potent in mediating T₄ sulfoconjugation in the liver of female rats than SULT1B1 (Kester *et al.*, 2003) also sulfoconjugate 2-naphthol (Falany *et al.*, 2005). Thus, if only SULT1B1 activity was upregulated by fipronil and/or fipronil sulfone treatments as suggested by increased mRNA *Sult1b1* expression, this effect might have been diluted by the activities of the other SULT isoforms measured by the assay.

Our results on *Ugt1a1* and *Sult1b1* mRNA expressions and on UGT1A activity suggest that fipronil and fipronil sulfone treatments similarly increase T₄ conjugation pathways. However, the involvement of other T₄ metabolic pathways, including deiodination cannot be excluded. In an attempt to gain more insights on deiodination pathways potentially involved in mediating fipronil- and/or fipronil sulfone-induced thyroid disruption, we focused on the effects of the treatments on plasma T₃ and T₂ concentrations in our THX + T₃, euthyroid-like rats. In the sample collected approximately 24 h after T₄ and 22 h after T₃ administrations, T₃ concentrations were significantly lower in treated animals in experiment 2. The T₃ source in this sample could not be purely exogenous as T₃ could result from the deiodination of T₄ administered for the kinetic investigation. However, at the time at which T₃ was measured, almost no T₄ remained in the blood, suggesting that the T₃ assayed was most likely from exogenous origin. Thus, it can be reasonably assumed that the difference in plasma T₃ concentrations observed at this time reflected an increase in exogenous T₃ elimination rather than a decreased production rate through T₄ deiodination. Accordingly, plasma T₃ and T₂ concentrations in pooled samples were always lower in the treated groups than in the vehicle control group. This strengthens the hypothesis that T₃ and T₂ clearances might have also been increased by fipronil and fipronil sulfone treatments. Alternatively, it cannot be excluded that those treatments might have been associated to a decrease in T₂ and/or T₃ production rate. Such an inhibition of the thyroid-regulating deiodinases has been described after treatment of human liver with halogenated phenolic contaminants, which, as fipronil, disrupt circulating levels of thyroid hormones (Butt *et al.*, 2011). Finally, it is clear that even though an induction of deiodination pathways might have occurred, it was not high enough to balance a potential increase in T₂ and/or T₃ elimination rates. In conclusion, we were not able to provide evidence from this study that metabolic pathways other than conjugation might also be involved in fipronil- or fipronil

sulfone-induced thyroid disruption in rats. However, for all the parameters that we evaluated (metabolic profiles, enzyme activity, mRNA or protein expression), exclusive fipronil sulfone treatment led to the same effects as fipronil treatment.

Both fipronil and fipronil sulfone treatments increased antipyrine clearance, which is considered as a relevant biomarker for CYP activity *in vivo* in different species (Chan and Yeung, 2006; St Peter *et al.*, 1991). In agreement with data on antipyrine hepatic metabolism (Engel *et al.*, 1996), this increase in CYP activity was associated with increased rat *Cyp3a1* and *Cyp2b2* mRNA expressions. This was consistent with data obtained on human hepatocytes (Das *et al.*, 2006) in which fipronil induced the human orthologs *Cyp3a4* and *Cyp2b6*. The increased *Cyp3a1* mRNA expression in response to fipronil and fipronil sulfone treatments was associated with an increased protein expression of CYP3A. Thus, it is very likely that fipronil sulfone induces its own formation and that during a fipronil treatment, a dramatic increase in fipronil biotransformation into fipronil sulfone might increase the risk of fipronil sulfone exposure. Moreover, although *Cyp1a1* mRNA expression was increased by fipronil treatment in human hepatocytes (Das *et al.*, 2006), our experiment did not reveal an effect of fipronil and/or fipronil sulfone on the rat *Cyp1a1* ortholog. It is noteworthy, however, that induction of *Cyp1a1* in human hepatocytes occurred at fipronil concentrations in the culture medium mostly much higher than the plasma fipronil or fipronil sulfone concentrations present in our study *in vivo*. Overall, our results clearly showed that fipronil sulfone is a CYP inducer at least as efficient as fipronil itself and can target the same isoenzymes.

An increase in liver weight was observed with fipronil and fipronil sulfone treatments in experiment 2. The hepatomegaly is consistent with results of regulatory toxicological evaluations that showed an increase in rat liver weight after a fipronil treatment (AFSSA, 2005). It is noteworthy that both hepatomegaly and increased activity of hepatic enzymes have been shown to result from the activation of different types of xenosensor nuclear receptors. For example, the activation of the constitutive androstane receptor (CAR) and the pregnane X receptor (PXR) have been shown to be associated with hepatomegaly (Huang *et al.*, 2005; Ross *et al.*, 2010) and to regulate hepatic phase I enzymes, especially CYP2B and CYP3A, and phase II enzymes involved in hepatic xenobiotic and thyroid hormone metabolism (Konno *et al.*, 2008). Interestingly, fipronil has been shown to be a ligand of the human PXR *in vitro* (Lemaire *et al.*, 2006). It can thus be postulated that PXR and/or CAR can mediate fipronil- or fipronil sulfone-induced thyroid disruption.

In conclusion, fipronil sulfone treatment in rats can reproduce the effect of fipronil treatment on hepatic T₄ catabolism and on all CYP and conjugation enzyme expressions and activities, suggesting that the metabolite is at least as efficient as the parent molecule. It is noteworthy that, in the current experiment, rats were treated with relatively high doses

of fipronil or fipronil sulfone. Our conclusions might thus be limited to the maximal effect of fipronil and fipronil sulfone. A full dose-response experiment would be required to determine the relative potencies (concentration leading to half the maximal effect) of the two molecules and definitely conclude on their respective potentials as thyroid disruptors. Furthermore, the dose-response experiment would also be required to determine the full range of fipronil or fipronil sulfone concentrations that can induce an increased elimination of thyroid hormones. This could determine if the thyroid disrupting potential of fipronil or fipronil sulfone should be expressed at lower plasma concentrations, i.e., in the ng/ml range, such as those likely to occur in humans from the acknowledged domestic or professional uses of fipronil (AFSSA, 2005; Herin *et al.*, 2011) and/or accidental intoxication (Mohamed *et al.*, 2004). Further evaluations of the role of fipronil metabolism as a determining factor for the potential of fipronil as a thyroid disruptor appears to be a critical issue. Indeed, in regulatory toxicological evaluations, the potential contribution of fipronil sulfone to fipronil-induced thyroid disruption has not been addressed despite the fact that fipronil sulfone is the main metabolite formed *in vivo* in humans and can persist much longer in the organism than fipronil itself.

FUNDING

Midi-Pyrénées Region; French National Institute for Agromineral Research; French Ministry of Ecology and Sustainable Development (PNRPE 0000442).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Anne-Sylvie Kesteman for her technical support, Marc Audebert for his help with the Western blots, and Alain Bousquet-Mélou for his valuable advices on pharmacokinetic analyses. Conflict of interest: The authors declare that there is no conflict of interest relative to the major sources of funding that would prejudice their impartiality to the results of the study.

REFERENCES

- Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA). (2005). *Évaluation des risques pour la santé humaine liés à une exposition au fipronil*, p. 173.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
- Buntain, I. G., Hatten, L. R., Hawkins, D. W., Pearson, C. J., and Roberts, D. A. (1988). Derivatives of *N*-phenylpyrazoles. European patent: EP 0295117.
- Burchell, B., and Weatherill, P. (1981). 4-Nitrophenol UDPglucuronyltransferase (rat liver). *Methods Enzymol.* **77**, 169–177.
- Butt, C. M., Wang, D., and Stapleton, H. M. (2011). Halogenated phenolic contaminants inhibit the *in vitro* activity of the thyroid-regulating deiodinases in human liver. *Toxicol. Sci.* **124**, 339–347.
- Chun, S. L., and Yeung, J. H. (2006). Modulation of antipyrine clearance by polysaccharide peptide (PSP) isolated from *Coriaria versicolor* in the rat. *Food Chem. Toxicol.* **44**, 1607–1612.
- Cole, L. M., Nicholson, R. A., and Casida, J. E. (1993). Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. *Pestic. Biochem. Physiol.* **46**, 47–54.
- Connolly, P. (2001). Environmental fate of fipronil. Department of Pesticide Regulation, California Environmental Protection Agency, pp. 1–17. Available at: http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/efate_archive/fipronil.pdf. Last accessed April 4, 2012.
- Das, P. C., Cao, Y., Cherrington, N., Hodgson, E., and Rose, R. L. (2006). Fipronil induces CYP 1A6 and cytotoxicity in human hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.* **164**, 200–214.
- Döhler, K. D., Wong, C. C., and von zur Mühlen, A. (1979). The rat as model for the study of drug effects on thyroid function: Consideration of methodological problems. *Pharmacol. Ther. B* **5**, 305–318.
- Engel, G., Hofmann, U., Heidemann, H., Cosme, J., and Eichelbaum, M. (1996). Antipyrine as a probe for human oxidative drug metabolism: Identification of the cytochrome P450 enzymes catalyzing 4-hydroxyantipyrine, 3-hydroxymethylantipyrine, and norantipyrine formation. *Clin. Pharmacol. Ther.* **59**, 613–623.
- Falany, C. N., Strom, P., and Swedmark, S. (2005). Sulphation of o-desmethylnaproxen and related compounds by human cytosolic sulfotransferases. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **60**, 632–640.
- Gamage, N., Barnett, A., Hempel, N., Daggley, R. G., Windmill, K. F., Martin, J. L., and McManus, M. E. (2006). Human sulfotransferases and their role in chemical metabolism. *Toxicol. Sci.* **90**, 5–22.
- Herin, F., Boutet-Robinet, E., Levant, A., Dalaurent, S., Manika, M., Galaty-Bouja, F., Caron, P., and Soulat, J. M. (2011). Thyroid function tests in persons with occupational exposure to fipronil. *Thyroid* **21**, 701–706.
- Huang, W., Zhang, J., Washington, M., Liu, J., Parant, J. M., Lozano, G., and Moore, D. D. (2005). Xenobiotic stress induces hepatomegaly and liver tumors via the nuclear receptor constitutive androstane receptor. *Mol. Endocrinol.* **19**, 1646–1653.
- Kesler, M. H., Kaptein, E., Roest, T. J., van Dijk, C. H., Tibboel, D., Meind, W., Glat, H., Coughtrie, M. W., and Visser, T. J. (2003). Characterization of rat iodothyronine sulfotransferases. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **285**, E592–E598.
- Komuro, Y., Negishi, M., and Kodama, S. (2008). The roles of nuclear receptors CAR and PXR in hepatic energy metabolism. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **23**, 8–13.
- Lacroix, M. Z., Puel, S., Toutain, P. L., and Viguié, C. (2010). Quantification of fipronil and its metabolic fipronil sulfone in rat plasma over a wide range of concentrations by LC/UV/MS. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **878**, 1934–1938.
- Leghuit, J., Gayard, V., Picard-Hagen, N., Camp, M., Perdu, E., Toutain, P. L., and Viguié, C. (2009). Fipronil-induced disruption of thyroid function in rats is mediated by increased total and free thyroxine clearances concomitantly to increased activity of hepatic enzymes. *Toxicology* **255**, 38–44.
- Leghuit, J., Gayard, V., Toutain, P. L., Picard-Hagen, N., and Viguié, C. (2010). Is the mechanism of fipronil-induced thyroid disruption specific of the rat: Re-evaluation of fipronil thyroid toxicity in sheep? *Toxicol. Lett.* **194**, 51–57.
- Lemaire, G., Mui, W., Pascucci, J. M., Pillon, A., Rahenoelina, F., Fenet, H., Gomez, E., Casellas, C., Nicolas, J. C., Cavailles, V., *et al.* (2006). Identification of new human pregnane X receptor ligands among pesticides using a stable reporter cell system. *Toxicol. Sci.* **91**, 501–509.

- Liddle, C., Goodwin, B. J., George, J., Tapner, M., and Farrell, G. C. (1998). Separate and interactive regulation of cytochrome P450 3A4 by triiodothyronine, dexamethasone, and growth hormone in cultured hepatocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**, 2411–2416.
- Masmoudi, T., Hibi, A. K., Vazquez, M., Artur, Y., Desvergne, B., Wahli, W., and Goudonnet, H. (1997). Transcriptional regulation by triiodothyronine of the UDP-glucuronosyltransferase family 1 gene complex in rat liver. Comparison with induction by 3-methylcholanthrene. *J. Biol. Chem.* **272**, 17171–17175.
- Matthew, D. E., and Houston, J. B. (1990). Drug metabolizing capacity in vitro and in vivo—II. Correlations between hepatic microsomal monooxygenase markers in phenobarbital-induced rats. *Biochem. Pharmacol.* **40**, 751–758.
- Mohamed, F., Senarathna, L., Percy, A., Abeyewardene, M., Eaglesham, G., Cheng, R., Azher, S., Hittarage, A., Dissanayake, W., Sheriff, M. H., et al. (2004). Acute human self-poisoning with the N-phenylpyrazole insecticide fipronil—A GABAA-gated chloride channel blocker. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **42**, 955–963.
- Peters, W. H., te Morsche, R. H., and Roelofs, H. M. (2003). Combined polymorphisms in UDP-glucuronosyltransferases 1A1 and 1A6: Implications for patients with Gilbert's syndrome. *J. Hepatol.* **38**, 3–8.
- Ross, J., Plummer, S. M., Rode, A., Scheer, N., Bower, C. C., Vogel, O., Henderson, C. J., Wolf, C. R., and Hecombe, C. R. (2010). Human constitutive androstane receptor (CAR) and pregnane X receptor (PXR) support the hypertrophic but not the hyperplastic response to the marine nongenotoxic hepatocarcinogens phenobarbital and chlordane in vivo. *Toxicol. Sci.* **116**, 452–466.
- Sekun, R. D., Duffel, M. W., and Jakoby, W. B. (1981). Aryl sulfotransferases. *Methods Enzymol.* **77**, 197–206.
- Sheng, J. J., Sharma, V., and Duffel, M. W. (2001). Measurement of aryl and alcohol sulfotransferase activity. *Curr. Protoc. Toxicol.* Chapter 4, Unit 4.5.
- Soldin, O. P., Soldin, S. J., Vinks, A. A., Younis, I., and Landy, H. J. (2010). Longitudinal comparison of thyroxine pharmacokinetics between pregnant and nonpregnant women: A stable isotope study. *Ther. Drug Monit.* **32**, 767–773.
- St Peter, J. V., Abul-Hajj, Y., and Awari, W. M. (1991). The pharmacokinetics of antipyrine and three of its metabolites in the rabbit: Intravenous administration of pure metabolites. *Pharm. Res.* **8**, 1470–1476.
- Tanaka, E., Kobayashi, S., Azamphongphun, A., Kurata, N., Oguchi, K., Kuroiwa, Y., and Yasuhara, H. (1985). The effect of indomethacin on hepatic drug-oxidizing capacity in the rat: Trimethadione and antipyrine metabolism as an indicator. *J. Pharmacobiodyn.* **8**, 773–779.
- Tang, J., Azim Usmani, K., Hodgson, E., and Rose, R. L. (2004). In vitro metabolism of fipronil by human and rat cytochrome P450 and its interactions with testosterone and diazepam. *Chem. Biol. Interact.* **147**, 319–329.
- Topo, E., Fisher, G., Scriccelli, A., Errico, F., Usiello, A., and D'Aiello, A. (2010). Thyroid hormones and D-aspartic acid, D-aspartate oxidase, D-aspartate racemase, H₂O₂, and ROS in rats and mice. *Chem. Biodivers.* **7**, 1467–1478.
- Visser, T. J., Kaptein, E., van Toor, H., van Raaij, J. A., van den Berg, K. J., Joe, C. T., van Engelen, J. G., and Brouwer, A. (1993). Glucuronidation of thyroid hormone in rat liver: Effects of in vivo treatment with microsomal enzyme inducers and in vitro assay conditions. *Endocrinology* **133**, 2177–2186.
- Weiss, M. (1988). A general model of metabolite kinetics following intravenous and oral administration of the parent drug. *Biopharm. Drug Dispos.* **9**, 159–176.
- Weiss, M. (1990). Use of metabolite AUC data in bioavailability studies to discriminate between absorption and first-pass extraction. *Clin. Pharmacokinet.* **18**, 419–422.
- Wu, S. Y., Green, W. L., Huang, W. S., Hays, M. T., and Chopra, I. J. (2005). Alternate pathways of thyroid hormone metabolism. *Thyroid* **15**, 943–958.
- Zalko, D., Prouillac, C., Rin, A., Perdu, E., Dolo, L., Jouanin, L., Caset, C., Debrauwer, L., and Cravedi, J. P. (2006). Biotransformation of the flame retardant tetrabromo-bisphenol A by human and rat sub-cellular liver fractions. *Chemosphere* **64**, 318–327.

ERRATUM ARTICLE TOXICOLOGIE COMPARATIVE *IN VIVO*

ERRATUM - CYP450-dependent biotransformation of the insecticide fipronil into fipronil sulfone can mediate fipronil-induced thyroid disruption in rats.

Roques, B. B., Lacroix, M. Z., Puel, S., Gayrard, V., Picard-Hagen, N., Jouanin, I., Perdu, E., Martin, P. G., Viguié, C.

Under Press.

ERRATUM

CYP450-Dependent Biotransformation of the Insecticide Fipronil into Fipronil Sulfone Can Mediate Fipronil-Induced Thyroid Disruption in Rats

- 1.5 Béatrice B. Roques, Marlène Z. Lacroix, Sylvie Puel, Véronique Gayraud, Nicole Picard-Hagen, Isabelle Jouanin, Elisabeth Perdu, Pascal G. Martin, and Catherine Viguié
doi:10.1093/toxsci/kfs094
Toxicological Sciences 127(1), 29–41 (2012)

1.10

A posteriori careful examination of the dataset used for the initial publication of our results regarding pharmacokinetic investigation on fipronil and its main metabolite, fipronil sulfone, in rat showed fipronil and fipronil sulfone concentrations in blood following iv administration that were not consistent with concentrations observed following oral administration. Accordingly, the measured concentrations in the iv solutions appeared to be much lower than the expected nominal concentrations, suggesting a problem with the stability and/or the solubility of the molecules in the vehicle used for iv administration (ethanol/water, v/v), while the po doses appeared to be about 95% accurate. In addition, we initially performed the PK analysis on the base of estimated AUC at infinity (AUC_{inf}). Because of the extremely low elimination rate of fipronil sulfone, this might not be an adequate way to analyze our data on fipronil sulfone pharmacokinetic. Indeed, an accurate estimation of AUC_{inf} for a molecule with a very low elimination rate, i.e., an estimation for which no more than 20% of the predicted AUC_{inf} is accounted for by extrapolation, would require monitoring blood concentrations for a very long period of time, which is not possible in rats. As a consequence, the estimation of AUC_{inf} with our set of data is very likely to be inaccurate.

1.15

1.20

1.25

1.30

The pharmacokinetic investigation of fipronil and its main metabolite was thus performed again (experiment 1). Modifications of the experimental procedure and data analysis aiming at avoiding the pitfalls of the first experimentation have been performed as described below. The whole iv kinetic experiment was re-performed with a new vehicle solution (DMSO/ethanol/pyrogen-free water solution, vol/vol/vol) and the same dose than the one used for po administration (3.4 $\mu\text{mol/kg BW}$) to allow a direct estimation of bioavailability without correction for the dose. The stability of the solutions was checked by measuring fipronil and fipronil sulfone concentrations prior to administration. The accuracy of the doses appeared to be around 80%. The experiment was performed on 3 adult female rats for each molecule with fipronil sulfone obtained by chemical synthesis from fipronil. To monitor the time course of fipronil and fipronil sulfone plasma concentrations, blood (150 μL) was collected in heparinized tubes the day before and 0.25, 0.5, 2, 6, 10, 24, 48 and 120 h after administrations. Fipronil and fipronil sulfone were assayed with the same method as for po administration.

1.35

As previously, PK analysis was performed using noncompartmental analysis. However, the estimated AUC over 120 h following administration (AUC_{0-120}) was used instead of estimated AUC_{inf} to calculate the oral bioavailabilities (F) according to equation 1, and the biotransformation rate of fipronil into fipronil sulfone following iv administration (T) according to equation 2:

$$F_{\text{molecule}}(\%) = \frac{\text{molecule}AUC_{0-120, po}}{\text{molecule}AUC_{0-120, iv}} \times 100 \quad (1)$$

1.40

$$T(\%) = \frac{\text{fipronil sulfone}Dose_p}{\text{fipronil sulfone}AUC_{0-120, after fipronil sulfone iv}} \times \frac{\text{fipronil sulfone}AUC_{0-120, after fipronil iv}}{\text{fipronil}Dose_p} \times 100 \quad (2)$$

1.45

As shown in the new version of fig. 2, equimolar po administrations of fipronil and fipronil sulfone led to similar fipronil sulfone plasma concentrations time courses. In addition, fipronil sulfone appeared to be very slowly eliminated whatever the administration route. AUC_{0-120} were 3930 and 5662 ng/mL/h for fipronil and fipronil sulfone after fipronil administration iv, respectively; 3283 and 14,612 ng/mL/h for fipronil and fipronil sulfone after fipronil administration po, respectively; and 7780 and 10,264 ng/mL/h for fipronil sulfone after fipronil sulfone iv and po administrations, respectively. Fipronil and fipronil sulfone oral bioavailabilities were very high (estimated values at 84 and 132%, for fipronil and fipronil sulfone, respectively). After iv administration of fipronil, the rate of biotransformation of fipronil into fipronil sulfone was estimated at 75%. In the first set of data, the AUC_{0-120} following iv administration of a dose of 3 mg/kg were 4858 and 4217 ng/mL/h for fipronil and fipronil sulfone, respectively. Thus, those AUCs,

1.50

2

ERRATUM

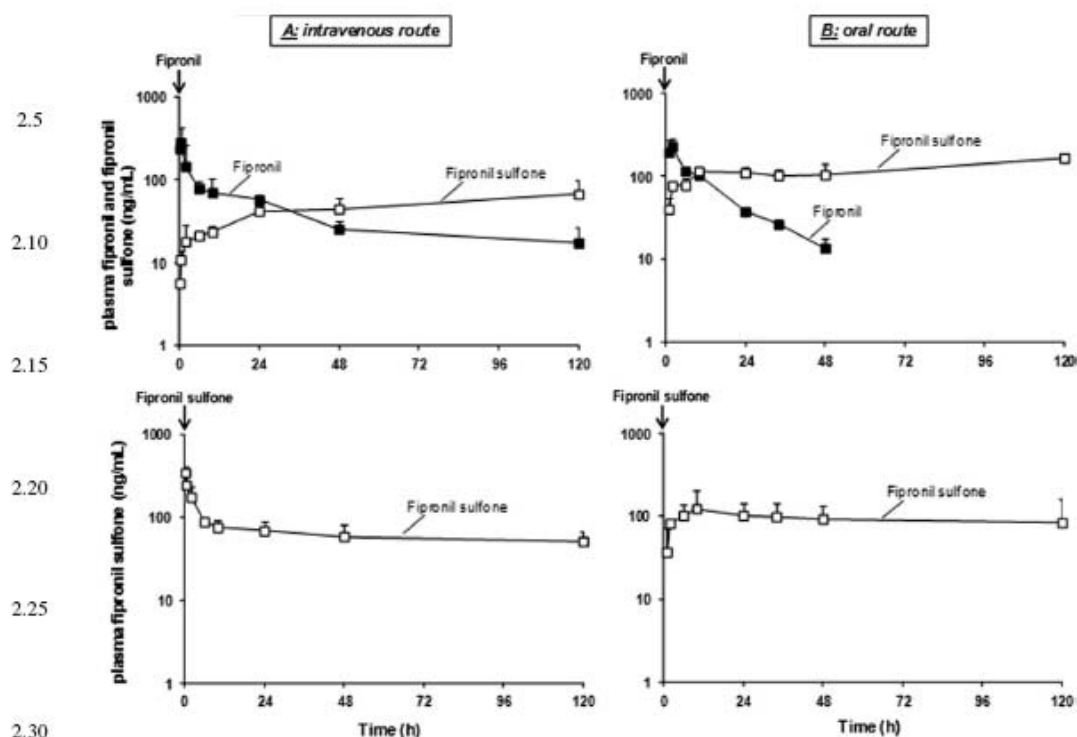


FIG. 2. Time course of mean ($\pm$ SD) plasma fipronil (■) and fipronil sulfone (□) concentrations after an iv (A) or a po (B) bolus of fipronil (top graphs) or fipronil sulfone (bottom graphs). Fipronil and fipronil sulfone plasma concentrations were measured in blood samples collected the day before and 0.25, 0.5, 2, 6, 10, 24, 48 and 120 h after fipronil or fipronil sulfone iv administration and the day before and 1, 2, 6, 10, 24, 34, 48, 120, 168 and 216 h after fipronil or fipronil sulfone po administrations. For po administration, data were truncated to the first 120 h because only the 0–120 h data were used for analysis.

when corrected by the doses, appeared to be respectively 1.6- and 3.6-fold lower than the one obtained in the second set of experiment, confirming that our doses were not accurate.

Our data clearly showed that both fipronil and fipronil sulfone are very efficiently absorbed po and that fipronil is highly

converted into fipronil sulfone. Thus, our new results are in agreement with our former conclusion that an equimolar fipronil and fipronil sulfone dosing regimens, such as the ones used in the main experiment on fipronil-induced thyroid disruption, should result in similar fipronil sulfone plasma concentrations.

REFERENCES

- Aajoud, A., Raveton, M., Aouadi, H., Tissut, M., and Ravanel, P. (2006). Uptake and xylem transport of fipronil in sunflower. *J Agric Food Chem* **54**, 5055-60.
- Abel, E. D., Ahima, R. S., Boers, M. E., Elmquist, J. K., and Wondisford, F. E. (2001). Critical role for thyroid hormone receptor $\beta 2$ in the regulation of paraventricular Thyrotropin-releasing hormone neurons. *J Clin Invest* **107**, 1017-23.
- AFSSA (2005). Evaluation des risques pour la santé humaine liés à une exposition au fipronil, pp. 173.
- Audebert, M., Riu, A., Jacques, C., Hillenweck, A., Jamin, E. J., Zalko, D., Cravedi, J. P. (2010). Use of the γ H2AX assay for assessing the genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell lines. *Toxicol Lett* **199**, 182-92.
- Baltaci, A. K., Mogulkoc, R., Kul, A., Bediz, C. S., Ugur, A. (2004). Opposite effects of zinc and melatonin on thyroid hormones in rats. *Toxicology* **195**, 69-75.
- Beckett, G. J., and Arthur, J. R. (2005). Selenium and endocrine systems. *J Endocrinol* **184**, 455-65.
- Bégué, J. M., Guguen-Guillouzo, C., Padeloup, N., and Guillouzo, A. (1984). Prolonged maintenance of active cytochrome P450 in adult rat hepatocytes co-cultured with another liver cell type. *Hepatology* **4**, 839-42.
- Bernal, J. (2007). Thyroid hormone receptors in brain development and function. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* **3**, 249-59.
- Berry, M. N., and Friend, D. S. (1969). High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol* **43**, 506-20.
- Berry, M. J., Grieco, D., Taylor, B. A., Maia, A. L., Kieffer, J. D., Beamer, W., Glover, E., Poland, A., and Larsen, P. R. (1993). Physiological and genetic analyses of inbred mouse strains with a type I iodothyronine 5' deiodinase deficiency. *J Clin Invest* **92**, 1517-28.
- Bertilsson, G., Heidrich, J., Svensson, K., Asman, M., Jendeberg, L., Sydow-Backman, M., Ohlsson, R., Postlind, H., Blomquist, P., and Berkenstam, A. (1998). Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 12208-13.
- Bhatkar, S. V., Rajan, M. G. R., Velumani, A., and Samuel, A. M. (2004). Thyroid hormone binding protein abnormalities in patients referred for thyroid disorders. *Indian J Med Res* **120**, 160-65.
- Bianco, A. C., and Kim, B. W. (2006). Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J Clin Invest* **116**, 2571-79.

- Blumberg, B., Sabbagh, W., Jr., Juguilon, H., Bolado, J., Jr., van Meter, C. M., Ong, E. S., and Evans, R. M. (1998). SXR, a novel steroid and xenobiotic-sensing nuclear receptor. *Genes Dev* **12**, 3195-3205.
- Bousquet-Mélou, A., Laffont, C. M., Laroute, V., and Toutain P. L. (2002). Modelling the loss of metabolic capacities of cultured hepatocytes: application to measurement of Michaelis-Menten kinetic parameters in *in vitro* systems. *Xenobiotica* **32**, 895-906.
- Borst, P., Evers, R., Kool, M., and Wijnholds, J. (2000). A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* **92**, 1295-302.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Breous, E., Wenzel, A., and Loos, U. (2005). The promoter of the human sodium/iodide symporter responds to certain phthalate plasticisers. *Mol Cell Endocrinol* **244**, 75-78.
- Buntain, I. G., Hatton, L. R., Hawkins, D. W., Pearson, C. J., and Roberts, D. A. (1988). Derivatives of N-phenylpyrazoles. European patent: EP 0295117.
- Burchell, B., and Weatherill, P. (1981). 4-nitrophenol UDPglucuronyltransferase (rat liver). *Methods Enzymol* **77**, 169-77.
- Burger, A. G., Engler, D., Buergi, U., Weissel, M., Steiger, G., Ingbar, S. H., Rosin, R. E., and Babior, B. M. (1983). Ether link cleavage is the major pathway of iodothyronine metabolism in the phagocytosing human leukocyte and also occurs *in vivo* in the rat. *J Clin Invest* **71**, 935-49.
- Butler, W. H., Gabriel, K. L., Preiss, F. J., and Osimitz, T. G. (1996). Lack of genotoxicity of piperonyl butoxide. *Mut Res* **371**, 249-58.
- Butt, C. M., Wang, D. and Stapleton, H. M. (2011). Halogenated phenolic contaminants inhibit the *in vitro* activity of the thyroid-regulating deiodinases in human liver. *Toxicol Sci* **124**, 339-47.
- Byard, J., and Needham, D. (2006). Metabolism and excretion of piperonyl butoxide in the rat. *Xenobiotica* **36**, 1259-72.
- Carlson, R. (1962). Silent spring. *The New Yorker magazine*, June 16, 23 and 30.
- Caroldi, S. (1992). Piperonyl butoxide. *J Med Plant Res*, 317-24.
- Chan, S. L., and Yeung, J. H. (2006). Modulation of antipyrine clearance by polysaccharide peptide (PSP) isolated from *Coriolus versicolor* in the rat. *Food Chem Toxicol* **44**, 1607-12.
- Cheek, A. O., Kow, K., Chen J., and McLachlan, J. A. (1999). Potential mechanisms of thyroid disruption in humans: interaction of organochlorine compounds with thyroid

- receptor, transthyretin, and thyroid-binding globulin. *Environ Health Perspect* **107**, 273-78.
- Chen, C., Staudinger, J. L., and Klaassen, C. D. (2003). Nuclear receptor, Pregnane X Receptor, is required for induction of UDP-glucuronosyltransferases in mouse liver by pregnenolone-16 α -carbonitrile. *Drug Metab Dispos* **31**, 908-15.
- Choi, C. H. (2005). ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell Int*, 5-30.
- Choksi, N. Y., Jahnke, G. D., St Hilaire, C., and Shelby, M. (2003). Role of thyroid hormones in human and laboratory animal reproductive health. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* **68**, 479-91.
- Chrencik, J. E., Orans, J., Moore, L. B., Xue, Y., Peng, L., Collins, J. L., Wisely, G. B., Lambert, M. H., Kliewer, S. A., and Redinbo, M. R. (2005). Structural disorder in the complex of human pregnane X receptor and the macrolide antibiotic rifampicin. *Mol Endocrinol* **19**, 1125-34.
- Claikens, V., Pirson, P., and Schneider, Y. J. (1987). Procédé de culture des hépatocytes et co-cultures d'hépatocytes et de cellules épithéliales de foie traitées. Patent EP0218448 A1 & Patent EP021488B1.
- Comité de la prévention et de la précaution, Ministère de l'écologie et du développement durable (2003). Les perturbateurs endocriniens: quels risques ?, pp.16.
- Connelly, P. (2001). Environmental fate of fipronil.
- Cravedi, J. P., Delous, G., Zalko, D., Viguié, C., and Debrauwer, L. (Under Review). Disposition of fipronil in rats. *Chemosphere*.
- Curran, P. G., and DeGroot, L. J. (1991). The effect of hepatic enzyme-inducing drugs on thyroid hormones and the thyroid gland. *Endocr Rev* **12**, 135-50.
- Das, P. C., Cao, Y., Cherrington, N., Hodgson, E., and Rose, R. L. (2006). Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes. *Chem Biol Interact* **164**, 200-14.
- Divi, R. L. and Doerge, D. R. (1996). Inhibition of thyroid peroxidase by dietary flavonoids. *Chem Res Toxicol* **9**, 16-23.
- Dohán, O., De la Vieja, A., Paroder, V., Riedel, C., Artani, M., Reed, M., Ginter, C. S., and Carrasco, N. (2003). The sodium/iodide symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. *Endocr Rev* **24**, 48-77.
- Döhler, K. D., Wong, C. C., and von zur Muhlen, A. (1979). The rat as model for the study of drug effects on thyroid function: consideration of methodological problems. *Pharmacol Ther B* **5**, 305-18.

- EFSA (2006). Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance fipronil, pp. 110.
- Emi, Y., Ikushiro, S-I, and Kato, Y. (2007). Thyroxine-metabolizing rat uridine Diphosphate-glucuronosyltransferase 1A7 is regulated by thyroid hormone receptor. *Endocrinology* **148**, 6124-33.
- Engel, G., Hofmann, U., Heidemann, H., Cosme, J., and Eichelbaum, M. (1996). Antipyrine as a probe for human oxidative drug metabolism: identification of the cytochrome P450 enzymes catalyzing 4-hydroxyantipyrine, 3-hydroxymethylantipyrine, and norantipyrine formation. *Clin Pharmacol Ther* **59**, 613-23.
- European Workshop on the impact of endocrine disruptors on human health and wildlife (1996).
- Falany, C. N., Strom, P., and Swedmark, S. (2005). Sulphation of o-desmethylnaproxen and related compounds by human cytosolic sulfotransferases. *Br J Clin Pharmacol* **60**, 632-40.
- Feldt-Rasmussen, U., and Rasmussen, A. (2007). Thyroid hormone transport and actions. *Pediatr Adolesc Med Basel* **11**, 80-103.
- Fini, J. B., Le Mevel, S., Turque, N., Palmier, K., Zalko, D., Cravedi, J. P., and Demeneix, B. (2007). An *in vivo* multiwell-based fluorescent screen for monitoring vertebrate thyroid hormone disruption. *Environ Sci Technol* **41**, 5908-14.
- Flink, I. L., Bailey, T. J., Gustafson, T. A., Markham, B. E., and Morkin, E. (1986). Complete amino acid sequence of human thyroxine-binding globulin deduced from cloned DNA: close homology to the serine antiproteases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**, 7708-12.
- Food and Drug Administration (2001). Guidance for industry: Bioanalytical method validation. <http://www.labcompliance.com/info/links/methods/guidelines.aspx>.
- Forrest, D., Hanebuth, E., Smeyne, R. J., Everds, N., Steward, C. L., Wehner, J. M., and Curran, T. (1996). Recessive resistance to thyroid hormone in mice lacking thyroid hormone receptor β : evidence for tissue-specific modulation of receptor function. *EMBO J* **15**, 3006-15.
- Fraichard, A., Chassande, O., Plateroti, M., Roux, J. P., Trouillas, J., Dehay, C., Legrand, C., Gauthier, K., Kedinger, M., Malaval, L., Rousset, B., and Samarut, J. (1997). The TR α gene encoding a thyroid hormone receptor is essential for post-natal development and thyroid hormone production. *EMBO J* **16**, 4412-20.
- Gamage, N., Barnett, A., Hempel, N., Duggleby, R. G., Windmill, K. F., Martin, J. L., and McManus, M. E. (2006). Human sulfotransferases and their role in chemical metabolism. *Toxicol Sci* **90**, 5-22.

- Gauthier, K., Chassande, O., Plateroti, M., Roux, J. P., Legrand, C., Pain, B., Rousset, B., Weiss, R., Trouillas, J., and Samarut, J. (1999). Different functions for the thyroid hormone receptors TR α and TR β in the control of thyroid hormone production and post-natal development. *EMBO J* **18**, 623-31.
- Glastein, M. M., Garcia-Bournissen, F., Giglio, N., Finkelstein, Y., and Koren, G. (2009). Pharmacologic treatment of hyperthyroidism during lactation. *Can Fam Physician* **55**, 797-98.
- Goldstein, J. A., Hickman, P., and Kimbrough, R. D. (1973). Effect of purified and technical piperonyl butoxide on drug-metabolizing enzymes and ultrastructure of rat liver. *Toxicol Appl Pharm* **26**, 444-58.
- Goodwin, B., Hodgson, E., and Liddle, C. (1999). The orphan human pregnane X receptor mediates the transcriptional activation of CYP3A4 by rifampicin through a distal enhancer module. *Mol Pharmacol* **56**, 1329-39.
- Guo, G. L., Choudhuri, S., and Klaassen, C. D. (2002). Induction profile of rat organic anion transporting polypeptide 2 (oatp2) by prototypical drug-metabolizing enzyme inducers that activate gene expression through ligand-activated transcription factor pathways. *J Pharmacol Exp Ther* **300**, 206-12.
- Hainzl, D., and Casida, J.E. (1996). Fipronil insecticide: novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 12764-12767.
- Hainzl, D., Cole, L. M., and Casida, J. E. (1998). Mechanisms for selective toxicity of fipronil insecticide and its sulfone metabolite and desulfinyl photoproduct. *Chem Res Toxicol* **11**, 1529-35.
- Halestrap, A. P., and Meredith, D. (2004). The SLC16 gene family - from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Eur J Physiol* **447**, 619-28.
- Halestrap, A. P. (2012). The monocarboxylate transporter family - Structure and functional characterization. *IUBMB Life*, **64**, 1-9.
- Handschin, C., and Meyer, U. A. (2003). Induction of drug metabolism: the role of nuclear receptors. *Pharmacol Rev* **55**, 649-73.
- Hays, M. T., and Hsu, L. (1987). Preparation and separation of the glucuronide and sulfate conjugates of thyroxine and triiodothyronine. *Endocr Res* **13**, 215-28.
- Heimeier, R. A., Das, B., Buchholz, D. R., and Shi, Y. B. (2009). The xenoestrogen bisphenol A inhibits postembryonic vertebrate development by antagonizing gene regulation by thyroid hormone. *Endocrinology* **150**, 2964-73.

- Heimeier, R. A., and Shi, Y. B. (2010). Amphibian metamorphosis as a model for studying endocrine disruption on vertebrate development: Effect of bisphenol A on thyroid hormone action. *Gen Comp Endocrinol* **168**, 181-89.
- Herin, F., Boutet-Robinet, E., Levant, A., Dulaurent, S., Manika, M., Galatry-Bouju, F., Caron, P., Soulat, J.M. (2011). Thyroid function tests in persons with occupational exposure to fipronil. *Thyroid* **21**, 701-6.
- Heuer, H., and Visser, T. J. (2009). Minireview: pathophysiological importance of thyroid hormone transporters. *Endocrinology* **150**, 1078-38.
- Hoefig, C. S., Renko, K., Piehl, S., Scanlan, T. S., Bertoldi, M., Opladen, T., Hoffmann, G. F., Klein, J., Blankenstein, O., Schweizer, U., Köhrle, J. (2012). Does the aromatic L-amino acid decarboxylase contribute to thyronamine biosynthesis ? *Moll Cell Endocrinol* **349**, 195-201.
- Huang, W., Zhang, J., Washington, M., Liu, J., Parant, J. M., Lozano, G., and Moore, D. D. (2005). Xenobiotic stress induces hepatomegaly and liver tumors via the nuclear receptor constitutive androstane receptor. *Mol Endocrinol* **19**, 1646-53.
- Hurley, P. M. (1998). Mode of carcinogenic action of pesticides inducing thyroid follicular cell tumors in rodents. *Environ Health Perspect* **106**, 437-45.
- Ikeda, T., Zhao, X., Nagata, K., Kono, Y., Shono, T., Yeh, J. Z., and Narahashi, T. (2001). Fipronil modulation of γ -aminobutyric acid_A receptors in rat dorsal root ganglion neurons. *J Pharmacol Exp Ther* **296**, 914-21.
- Institut National de Santé Publique du Québec (2002). Evaluation des risques toxicologiques associés à l'utilisation d'adulticides dans le cadre d'un programme de lutte vectorielle contre la transmission du virus de Nil occidental; 17-20.
- InVS (2011). Evolution de l'incidence du cancer de la thyroïde en France métropolitaine - Bilan sur 25 ans, pp. 58.
- Ito, M. , and Roeder, R. G. (2001). The TRAP/SMCC/Mediator complex and thyroid hormone receptor function. *Trends Endocrinol Metab* **12**, 127-34.
- Jahnke, G. D., Choksi, N. Y., Moore, J. A., and Shelby, M. D. (2004). Thyroid toxicants: assessing reproductive health effects. *Environ Health Perspect* **112**, 363-68.
- Jancova, P., Anzenbacher, P., and Anzenbacherova, E. (2010). Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* **154**, 103-16.
- Jannini, E. A., Ulisse, S., and d'Armiento, M. (1995). Thyroid hormone and male gonadal function. *Endocr Rev* **16**, 443-59.
- Jigorel, E., Le Ve, M., Boursier-Neyret, C., Parmentier, Y., and Fardel, O. (2006). Differential regulation of sinusoidal and canalicular hepatic drug transporter

- expression by xenobiotics activating drug-sensing receptors in primary human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* **34**, 1756-63.
- Jiménez, J. J., Bernal, J. L., del Nozal, M. J., Martín, M. T., and Mayo, R. (2008). Sample preparation methods to analyze fipronil in honey by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometric detection. *J Chromatogr A* **1187**, 40-45.
- Jones, S. A., Moore, L. B., Shenk, J. L., Wisely, G. B., Hamilton, G. A., McKee, D. D., Tomkinson, N. C., LeCluyse, E. L., Lambert, M. H., Willson, T. M., *et al.* (2000). The pregnane X receptor: a promiscuous xenobiotic receptor that has diverged during evolution. *Mol Endocrinol* **14**, 27-39.
- Kalliokoski, A., and Niemi, M. (2009). Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br J Pharmacol* **158**, 693-705.
- Kaneko, J. J. (2008). Thyroid function. In *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, p 623-34.
- Kashiwagi, K., Furuno, N., Kitamura, S., Ohta, S., Sugihara, K., Utsumi, K., Hanada, H., Taniguchi, K., Suzuki, K. I., Kashiwagi, A. (2009). Disruption of thyroid hormone function by environmental pollutants. *J Health Sci* **55**, 147-60.
- Kelly, G. (2000). Peripheral metabolism of thyroid hormones: a review. *Altern Med Rev* **5**, 306-33.
- Kester, M. H., Kaptein, E., Roest, T. J., van Dijk, C. H., Tibboel, D., Meinel, W., Glatt, H., Coughtrie, M. W., and Visser, T. J. (2003). Characterization of rat iodothyronine sulfotransferases. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **285**, E592-98.
- Kinne, A., Schüle, R., and Krause, G. (2011). Primary and secondary thyroid hormone transporters. *Thyroid Res* **4**, Suppl 1:S7.
- Kiyosawa, N., Kwekel, J. C., Burgoon, L. D., Dere, E., Williams, K. J., Tashiro, C., Chittim, B., and Zacharewski, T. R. (2008). Species-specific regulation of PXR/CAR/ER-target genes in the mouse and rat liver elicited by o,p'-DDT. *BMC Genomics* **9**: 487, pp.13.
- Klachko, D. M., and Johnson, E. R. (1983). The liver and circulating thyroid hormones. *J Clin Gastroenterol* **5**, 465-71.
- Kliwer, S. A., Moore, J. T., Wade, L., Staudinger, J. L., Watson, M. A., Jones, S. A., McKee, D. D., Oliver, B. B., Willson, T. M., Zetterstrom, R. H., *et al.* (1998). An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell* **92**, 73-82.
- Konno, Y., Negishi, M., and Kodama, S. (2008). The roles of nuclear receptors CAR and PXR in hepatic energy metabolism. *Drug Metab Pharmacokinet* **23**, 8-13.

- Korhonen, L. E., Turpeinen, M., Rahnasto, M., Wittekindt, C., Poso, A., Pelkonen, O., Raunio, H., and Juvonen, R. O. (2007). New potent and selective cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) inhibitors based on three-dimensional quantitative structure-activity relationship (3D-QSAR) analysis. *Br J Pharmacol* **150**, 932-42.
- Krassas, G. E. (2000). Thyroid disease and female reproduction. *Fertil Steril* **74**, 1063-70.
- Kretschmer, X. C., and Baldwin, W. S. (2005). CAR and PXR: xenosensors of endocrine disrupters? *Chem Biol Interact* **155**, 111-28.
- Kubota, K., Uchimura, H., Mitsuhashi, T., Chiu, S. C., Kuzuya, N., Ito, K., and Nagataki, S. (1985). Peroxidatic degradation and ether link cleavage of thyroxine in a particulate fraction of human thyroid. *Life Sci* **36**, 1033-39.
- Lachowicz, K., Koszela-Piotrowska, I., Rosolowska-Huszcz, D. (2009). Dietary fat type and level affect thyroid hormone plasma concentrations in rats. *J Anim Feed Sci* **18**, 541-50.
- Lacroix, M. Z., Puel, S., Toutain, P. L., and Viguié, C. (2010). Quantification of fipronil and its metabolite fipronil sulfone in rat plasma over a wide range of concentrations by LC/UV/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **878**, 1934-38.
- Landers, K. A., McKinnon, B. D., Huika, L., Subramaniam, V. N., Mortimer, R. H., and Richard, K. (1952). Carrier-mediated thyroid hormone transport into placenta by placental transthyretin. *J Clin Endocrinol Metab* **94**, 2610-6.
- Lans, M. C., Spiertz, C., Brouwer, A., and Koeman, J. H. (1994). Different competition of thyroxine binding to transthyretin and thyroxine-binding globulin by hydroxy(PCBs, PCDDs and PCDFs. *Eur J Pharmacol* **270**, 139-136.
- Larsen, P. R., Davies, T. F., Schlumberger, M. J., and Hay, I. D. (2002). Thyroid Physiology and Diagnostic Evaluation of Patients with Thyroid Disorders. In *Williams Textbook of Endocrinology*, pp. 331-53.
- Lazar, M. A. (2003). Thyroid hormone action: a binding contract. *J Clin Invest* **112**, 497-99.
- Lecureux, L., Dieter, M. Z., Nelson, D. M., Watson, L., Wong, H., Gemzik, B., Klaassen, C. D., and Lehman-McKeeman, L. D. (2009). Hepatobiliary disposition of thyroid hormone in mrp2-deficient TR⁻ rats: reduced biliary excretion of thyroxine glucuronide does not prevent xenobiotic-induced hypothyroidism. *Toxicol Sci* **108**, 482-91.
- Le Faouder, J., Bichon, E., Brunschwig, P., Landelle, R., Andre, F., and Le Bizec, B. (2007). Transfer assessment of fipronil residues from feed to cow milk. *Talanta* **73**, 710-17.
- Leghait, J., Gayrard, V., Picard-Hagen, N., Camp, M., Perdu, E., Toutain, P. L., and Viguié, C. (2009). Fipronil-induced disruption of thyroid function in rats is mediated

- by increased total and free thyroxine clearances concomitantly to increased activity of hepatic enzymes. *Toxicology* **255**, 38-44.
- Leghait, J., Gayraud, V., Toutain, P. L., Picard-Hagen, N., and Viguié, C. (2010). Is the mechanisms of fipronil-induced thyroid disruption specific of the rat: Re-evaluation of fipronil thyroid toxicity in sheep? *Toxicol Lett* **194**, 51-57.
- Lehmann, J. M., McKee, D. D., Watson, M. A., Willson, T. M., Moore, J. T., and Kliewer, S. A. (1998). The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *J Clin Invest* **102**, 1016-23.
- Lemaire, G., Mnif, W., Pascussi, J. M., Pillon, A., Rabenoelina, F., Fenet, H., Gomez, E., Casellas, C., Nicolas, J. C., Cavailles, V., Duchesne, M. J., and Balaguer, P. (2006). Identification of new human pregnane X receptor ligands among pesticides using a stable reporter cell system. *Toxicol Sci* **91**, 501-9.
- Li, P., and Akk, G. (2008). The insecticide fipronil and its metabolite fipronil sulphone inhibit the rat $\alpha 1B2\gamma 2L$ GABA_A receptor. *Br J Pharmacol* **155**, 783-94.
- Liddle, C., Goodwin, B. J., George, J., Tapner, M., and Farrell, G. C. (1998). Separate and interactive regulation of cytochrome P450 3A4 by triiodothyronine, dexamethasone, and growth hormone in cultured hepatocytes. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 2411-16.
- Maglich, J. M., Parks, D. J., Moore, L. B., Collins, J. L., Goodwin, B., Billin, A. N., Stoltz, C. A., Kliewer, S. A., Lambert, M. H., Willson, T. M., and Moore, J. T. (2003). Identification of a novel human constitutive androstane receptor (CAR) agonist and its use in the identification of CAR target genes. *J Biol Chem* **278**, 17277-83.
- Maglich, J. M., Watson, J., McMillen, P. J., Goodwin, B., Willson, T. M., and Moore, J. T. (2004). The nuclear receptor CAR is a regulator of thyroid hormone metabolism during caloric restriction. *J Biol Chem* **279**, 19832-38.
- Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., and Evans, R. M. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**, 835-39.
- Masmoudi, T., Hihi, A. K., Vazquez, M., Artur, Y., Desvergne, B., Wahli, W., and Goudonnet, H. (1997). Transcriptional regulation by triiodothyronine of the UDP-glucuronosyltransferase family 1 gene complex in rat liver. Comparison with induction by 3-methylcholanthrene. *J Biol Chem* **272**, 17171-75.
- Mason, G. A., Garbutt, J. C., and Prange, A. J. (1995). Thyrotropin-Releasing Hormone - Focus on basic neurobiology. In *Psychopharmacology: the fourth generation of progress* (Raven Press Inc.), pp. 493-503.

- Matthew, D. E., and Houston, J. B. (1990). Drug metabolizing capacity in vitro and in vivo--II. Correlations between hepatic microsomal monooxygenase markers in phenobarbital-induced rats. *Biochem Pharmacol* **40**, 751-58.
- Medina-Gomez, G., Calvo, R. M., and Obregon, M. J. (2008). Thermogenic effect of triiodothyroacetic acid at low doses in rat adipose tissue without adverse side effects in the thyroid axis. *Am J Physiology* **294**, E688-97.
- Meerts, I. A. T. M., van Zanden, J. J., Luijckx, E. A. C., van Leeuwen-Bol, I., Marsh, G., Jakobsson, E., Bergman, A., and Brouwer, A. (2000). Potent competitive interactions of some brominated flame retardants and related compounds with human transthyretin *in vitro*. *Toxicol Sci* **56**, 95-104.
- Mohamed, F., Senarathna, L., Percy, A., Abeyewardene, M., Eaglesham, G., Cheng, R., Azher, S., Hittarage, A., Dissanayake, W., Sheriff, M. H., Davies, W., Buckley, N. A., and Eddleston, M. (2004). Acute human self-poisoning with the N-phenylpyrazole insecticide fipronil--a GABAA-gated chloride channel blocker. *J Toxicol Clin Toxicol* **42**, 955-63.
- Moore, L. B., Goodwin, B., Jones, S. A., Wisely, G. B., Serabjit-Singh, C. J., Willson, T. M., Collins, J. L., and Kliewer, S. A. (2000a). St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 7500-02.
- Moore, L. B., Parks, D. J., Jones, S. A., Bledsoe, R. K., Consler, T. G., Stimmel, J. B., Goodwin, B., Liddle, C., Blanchard, S. G., Willson, T. M., *et al.* (2000b). Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands. *J Biol Chem* **275**, 15122-27.
- Mossmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**, 55-63.
- Narahashi, T., Zhao, X., Ikeda, T., Salgado, V. L., and Yeh, J. Z. (2010). Glutamate-activated chloride channels: unique fipronil targets present in insects but not in mammals. *Pest Biochem Physiol* **97**, 149-52.
- Nicoloff, J. T., Lox, J. C., Dussault, J. H., and Fisher, D. A. (1972). Simultaneous measurement of thyroxine and triiodothyronine peripheral turnover kinetics in man. *J Clin Invest* **51**, 473-83.
- Niknahad, H., and O'Brien, P. J. (2004). Involvement of cytochrome P-450 in n-butyl nitrite-induced hepatocyte cytotoxicity. *Iran J Pharm Sci* **1**, 11-19.
- Oh, J. D., Butcher, L. L., and Woolf, N. J. (1991). Thyroid hormone modulates the development of cholinergic terminal fields in the rat forebrain: relation to nerve growth factor receptor. *Brain Res Dev Brain Res* **59**, 133-42.

- Olefsky, J. M. (2001). Nuclear receptor Minireview series. *J Biol Chem* **276**, 36863-64.
- Oziol, L., Faure, P., Vergely, C., Rochette, L., Artur, Y., and Chomard, P. (2001). *In vitro* free radical scavenging capacity of thyroid hormones and structural analogues. *J Endocrinol* **170**, 197-206.
- Patrick, L. (2009). Thyroid disruption: mechanisms and clinical implications in human health. *Altern Med Rev* **14**, 326-46.
- Peters, W. H., te Morsche, R. H., and Roelofs, H. M. (2003). Combined polymorphisms in UDP-glucuronosyltransferases 1A1 and 1A6: implications for patients with Gilbert's syndrome. *J Hepatol* **38**, 3-8.
- Plateroti, M., Gauthier, K., Chassande, O., Flamant, F., and Samarut, J. (2002). Dissection génétique de la fonction des récepteurs nucléaires des hormones thyroïdiennes. *Médecine Thérapeutique Endocrinologie et Reproduction* **4**, 20-26.
- Porterfield, S. P., and Hendry, L. B. (1998). Impact of PCBs on thyroid hormone directed brain development. *Toxicol Ind Health* **14**, 103-20.
- Power, D. M., Elias, N. P., Richardson, S. J., Mendes, J., Soares, C. M., and Santos, C. R. A. (2000). Evolution of the thyroid hormone-binding protein, transthyrethin. *Gen Comp Endocrinol* **119**, 241-55.
- Psarra, A. M. G., and Sekeris, C. E. (2008). Steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria. *IUBMB Life* **60**, 210-23.
- Puymirat, J., Barret, A., Picart, R., Vigny, A., Loudes, C., Faivre-Bauman, A., and Tixier-Vidal, A. (1983). Triiodothyronine enhances the morphological maturation of dopaminergic neurons from fetal mouse hypothalamus cultured in serum-free medium. *Neuroscience* **10**, 801-10.
- Qatanani, M., Zhang, J., and Moore, D. D. (2005). Role of the constitutive androstane receptor in xenobiotic-induced thyroid hormone metabolism. *Endocrinology* **146**, 995-1002.
- Ren, H., Vallanat, B., Nelson, D. M., Yeung, L. W., Guruge, K. S., Lam, P. K., Lehman-McKeeman, L. D., Corton, J. C. (2009). Evidence for the involvement of xenobiotic-responsive nuclear receptors in transcriptional effects upon perfluoroalkyl acid exposure in diverse species. *Reprod Toxicol* **27**, 266-77.
- Robert, J. (2010). Signalisation cellulaire et cancer, pp. 335.
- Roques, B. B., Lacroix, M. Z., Puel, S., Gayrard, V., Picard-Hagen, N., Jouanin, I., Perdu, E., Martin, P. G., and Viguié, C. (2012). CYP450-dependent biotransformation of the insecticide fipronil into fipronil sulfone can mediate fipronil-induced thyroid disruption in rats. *Toxicol Sci* **127**, 29-41.

- Rouaze-Romet, M., Savu, L., Vranckx, R., Bleiberg-Daniel, F., Le Moullac, B., Gouache, P., and Nunez, E. A. (1992). Re-expression of thyroxine-binding globulin in post-weaning rats during protein or energy malnutrition. *Acta Endocrinol (Copenh)* **127**, 441-48.
- Ross, J., Plummer, S. M., Rode, A., Scheer, N., Bower, C. C., Vogel, O., Henderson, C. J., Wolf, C. R., and Elcombe, C. R. (2010). Human constitutive androstane receptor (CAR) and pregnane X receptor (PXR) support the hypertrophic but not the hyperplastic response to the murine nongenotoxic hepatocarcinogens phenobarbital and chlordane in vivo. *Toxicol Sci* **116**, 452-66.
- Santini, F., Vitti, P., Ceccarini, G., Mammoli, C., Rosellini, V., Pelosini, C., Marsili, A., Tonacchera, M., Agretti, P., Santoni, T., Chivato, L., and Pinchera, A. (2003). *In vitro* assay of thyroid disruptors affecting TSH-stimulated adenylate cyclase activity. *J Endocrinol Invest* **26**, 950-55.
- Savu, L., Vranckx, R., Maya, M., and Nunez, E. A. (1987). A thyroxine binding globulin (TBG)-like protein in the sera of developing and adult rats. *Biochem Biophys Res Commun* **148**, 1165-73.
- Savu, L., Vranckx, R., Rouaze-Romet, M., Maya, M., Nunez, E. A., Tréton, J., and Flink, I. L. (1991). A senescence up-regulated protein: the rat thyroxine-binding globulin (TBG). *Biochim Biophys Acta*, **1097**, 19-22.
- Schoenmakers, C. H. H. (1994). Enzymatic deiodination of thyroid hormones. *Doctoral Thesis*, pp. 118.
- Schussler, G. C. (2000). The thyroxine-binding proteins. *Thyroid* **10**, 141-49.
- Sekura, R. D., Duffel, M. W., and Jakoby, W. B. (1981). Aryl sulfotransferases. *Methods Enzymol* **77**, 197-206.
- Sheng, J. J., Sharma, V., and Duffel, M. W. (2001). Measurement of aryl and alcohol sulfotransferase activity. *Curr Protoc Toxicol Chapter 4*, Unit4 5.
- Shimada, N., and Yamauchi, K. (2004). Characteristics of 3,5,3'-triiodothyronine (T₃)-uptake system of tadpole red blood cells: effect of endocrine-disrupting chemicals on cellular T₃ response.
- Soldin, O. P., Soldin, S. J., Vinks, A. A., Younis, I., and Landy, H. J. (2010). Longitudinal comparison of thyroxine pharmacokinetics between pregnant and nonpregnant women: a stable isotope study. *Ther Drug Monit* **32**, 767-73.
- Staudinger, J.L., Goodwin, B., Jones, S. A., Hawkins-Brown, D., Mackenzie, K. I., LaTour, A., Liu, Y., Klaassen, C. D., Brown, K. K., Reinhard, J., Willson, T. M., Koller, B. H., and Kliever, S. A. (2001). The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. *Proc Natl Acad Sci* **98**, 3369-74.

- Stavrovskaya, A. A., and Stromskaya, T. P. (2008). Transport proteins of the ABC family and multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry (Mosc)* **73**, 592-604.
- St Peter, J. V., Abul-Hajj, Y., and Awni, W. M. (1991). The pharmacokinetics of antipyrine and three of its metabolites in the rabbit: intravenous administration of pure metabolites. *Pharm Res* **8**, 1470-76.
- Szabo, D. T., Richardson, V. M., Ross, D. G., Diliberto, J. J., Kodavanti, P. R. S., and Birnbaum, L. S. (2009). Effects of perinatal PBDE exposure on hepatic phase I, phase II, phase III, and deiodinase 1 gene expression involved in thyroid hormone metabolism in male rat pups. *Toxicol Sci* **107**, 27-39.
- Tadic, S. D., Elm, M. S., Li, H. S., van Londen, G. J., Subbotin, V. M., Whitcomb, D. C., and Eagon, P. K. (2002). Sex differences in hepatic gene expression in a rat model of ethanol-induced liver injury. *J Appl Physiol* **93**, 1057-68.
- Tan, S. A., Lewis, J. E., Berk, L. S., and Wilcox, R. B. (1990). Extrathyroidal physiology of moniodotyrosine in humans. *Clin Physiol Biochem* **8**, 109-15.
- Tanaka, E., Kobayashi, S., Aramphongphan, A., Kurata, N., Oguchi, K., Kuroiwa, Y., and Yasuhara, H. (1985). The effect of indomethacin on hepatic drug-oxidizing capacity in the rat: trimethadione and antipyrine metabolism as an indicator. *J Pharmacobiodyn* **8**, 773-79.
- Tang, J., Amin Usmani, K., Hodgson, E., and Rose, R. L. (2004). In vitro metabolism of fipronil by human and rat cytochrome P450 and its interactions with testosterone and diazepam. *Chem Biol Interact* **147**, 319-29.
- Tonacchera, M; Pinchera, A., Dimida, A., Ferrarini, E., Agretti, P., Vitti, P., Santini, F., Crump, K., and Gibbs, J. (2004). Relative potencies and additivity of perchlorate, thiocyanate, nitrate, and iodide on the inhibition of radioactive iodide uptake by the human sodium iodide symporter. *Thyroid* **14**, 1012-19.
- Tong, Z., Li, H., Goljer, I., McConnell, O., Chandrasekaran, A. (2007). *In vitro* glucuronidation of thyroxine and triiodothyronine by liver microsomes and recombinant human UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab Dispos* **35**, 2203-10.
- Topo, E., Fisher, G., Sorricelli, A., Errico, F., Usiello, A., and D'Aniello, A. (2010). Thyroid hormones and D-aspartic acid, D-aspartate oxidase, D-aspartate racemase, H₂O₂, and ROS in rats and mice. *Chem Biodivers* **7**, 1467-78.
- Trumpolt, C. W., Crain, M., Cullison, G. D., Flanagan, S. J. P., Siegel, L., and Lathrop, S. (2005). *Remediation Journal* **16**, 65-89.
- Tzamelis, I., Pissios, P., Schuetz, E. G., and Moore, D. D. (2000). The xenobiotic compound 1,4-bis[2-(3,5- dichloropyridyloxy)]benzene is an agonist ligand for the nuclear receptor CAR. *Mol Cell Biol* **20**, 2951-58.

- Vähäkangas, K., and Myllynen, P. (2009). Drug transporters in the human blood-placental barrier. *Br J Pharmacol* **158**, 665-78.
- van der Deure, W. M., Peeters, R. P., and Visser, T. J. (2010). Molecular aspects of thyroid hormone transporters, including MCT8, MCT10, and OATPs, and the effect of genetic variation in these transporters. *J Mol Endocrinol* **44**, 1-11.
- van der Heide, S. M., Joosten, B. J. L. J., Dragt, B. S., Everts, M. E., Klaren, P. H. M. (2006). A physiological role for glucuronidated thyroid hormones: preferential uptake by H9c2(2-1) myotubes. *Mol Cell Endocrinol* **264**, 109-17.
- Varro, P., Gyori, J., and Vilagi, I. (2009). *In vitro* effects of fipronil on neuronal excitability in mammalian and molluscan nervous systems. *An Agric Environ Med* **16**, 71-77.
- Vansell, N. R., and Klaassen, C. D. (2002). Increase in rat liver UDP-glucuronosyltransferase mRNA by microsomal enzyme inducers that enhance thyroid hormone glucuronidation. *Drug Metab Dispos* **30**, 240-46.
- Vierling, E. (2008). Aliments et boissons: filières et produits, pp. 281.
- Visser, T. J., Kaptein, E., van Raaij, J. A. G. M., Joe, C. T. T., Ebner, T., and Burchell, B. (1993a). Multiple UDP-glucuronyltransferases for the glucuronidation of thyroid hormone with preference for 3,3',5'-triiodothyronine (reverse T₃). *FEBS Lett* **315**, 65-68.
- Visser, T. J., Kaptein, E., van Toor, H., van Raaij, J. A., van den Berg, K. J., Joe, C. T. T., van Engelen, J. G., and Brouwer, A. (1993b). Glucuronidation of thyroid hormone in rat liver: effects of in vivo treatment with microsomal enzyme inducers and in vitro assay conditions. *Endocrinology* **133**, 2177-86.
- Visser, T. J., Kaptein, E., Glatt, H., Bartsch, I., Hagen, M., and Coughtrie, M. W. H. (1998). Characterization of thyroid hormone sulfotransferases. *Chem Biol Interact* **109**, 179-91.
- Visser, W. E., Friesema, E. C. H., Jansen, J., and Visser, T. J. (2007). Thyroid hormone transport in and out of cells. *Trends Endocrinol Metab* **19**, 50-56.
- Visser, W. E., Friesema, E. C. H., and Visser, T. J. (2011). Minireview: thyroid hormone transporters: the knows and the unknowns. *Mol Endocrinol* **25**, 1-14.
- Vranckx, R., Savu, L., Maya, M., and Nunez, E. A. (1990). Characterization of a major development-regulated serum thyroxine-binding globulin in the euthyroid mouse. *Biochem J* **271**, 373-79.
- Wagner, C. A., Lang, F., and Brüer, S. (2001). Function and structure of heterodimeric amino acid transporters. *Am J Physiol Cell Physiol* **281**, C1077-93.

- Watkins, J. B., and Klaassen, C. D. (1983). Chemically-induced alteration of UDP-glucuronic acid concentration in rat liver. *Drug Metab Dispos* **11**, 37-40.
- Watkins, R. E., Maglich, J. M., Moore, L. B., Wisely, G. B., Noble, S. M., Davis-Searles, P. R., Lambert, M. H., Kliewer, S. A., and Redinbo, M. R. (2003b). 2.1 A crystal structure of human PXR in complex with the St. John's wort compound hyperforin. *Biochemistry* **42**, 1430-1438.
- Wei, P., Zhang, J., Dowhan, D. H., Han, Y., and Moore, D. D. (2002). Specific and overlapping functions of the nuclear hormone receptors CAR and PXR in xenobiotic response. *Pharmacogenomics J* **2**, 117-26.
- Weiss, M. (1988). A general model of metabolite kinetics following intravenous and oral administration of the parent drug. *Biopharm Drug Dispos* **9**, 159-76.
- Weiss, M. (1990). Use of metabolite AUC data in bioavailability studies to discriminate between absorption and first-pass extraction. *Clin Pharmacokinet* **18**, 419-22.
- Weiss, R. E., Murata, Y., Cua, K., Hayashi, Y., Seo, H., and Refetoff, S. (1998). Thyroid hormone action on liver, heart and energy expenditure in thyroid hormone receptor β deficient mice. *Endocrinology* **139**, 4945-52.
- Wolff, J. (1998). Perchlorate and the thyroid gland. *Pharmacol Rev* **50**, 89-106.
- Wrutniak-Cabello, C., Casas, F., and Cabello, G. (2001). Thyroid hormone action in mitochondria. *J Mol Endocrinol* **26**, 67-77.
- Wu, S. Y., Green, W. L., Huang, W. S., Hays, M. T., and Chopra, I. J. (2005). Alternate pathways of thyroid hormone metabolism. *Thyroid* **15**, 943-58.
- Xie, W. (2008). Nuclear receptors in drug metabolism, pp. 330.
- Xu, C., Wang, X., and Staudinger, J. L. (2009). Regulation of tissue-specific carboxylestérase expression by pregnane x receptor and constitutive androstane receptor. *Drug Metab Dispos* **37**, 1539-47.
- Yamaoka, K., Nakagawa, T., and Uno, T. (1978). Application of Akaike's information criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations. *J Pharmacokinet Biopharm* **6**, 165-75.
- Yen, P. M. (2001). Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev* **81**, 1097-1142.
- Zalko, D., Prouillac, C., Riu, A., Perdu, E., Dolo, L., Jouanin, I., Canlet, C., Debrauwer, L., and Cravedi, J. P. (2006). Biotransformation of the flame retardant tetrabromobisphenol A by human and rat sub-cellular liver fractions. *Chemosphere* **64**, 318-27.
- Zhao, X., Yeh, J. Z., Salgado, V. L., and Narahashi, T. (2005). Sulfone metabolite of fipronil blocks γ -aminobutyric acid- and glutamate-activated chloride channels in mammalian and insect neurons. *J Pharmacol Exp Ther* **314**, 363-73.

- Zhou, S., Yung Chan, S., Cher Goh, B., Chan, E., Duan, W., Huang, M., and McLeod, H. L. (2005). Mechanism-based inhibition of cytochrome P450 3A4 by therapeutic drugs. *Clin Pharmacokinet* **44**, 279-304.
- Zhu, Z., Kim, S., Chen, T., Lin, J. H., Bell, A., Bryson, J., Dubaquié, Y., Yan, N., Yanchunas, J., Xie, D., *et al.* (2004). Correlation of high-throughput pregnane X receptor (PXR) transactivation and binding assays. *J Biomol Screen* **9**, 533-540.
- Zoeller, R. T. (2005). Environmental chemicals as thyroid hormone analogues: new studies indicate that thyroid hormone receptors are targets of industrial chemicals ? *Mol Cell Endocrinol* **242**, 10-15.
- Zoeller, T. R. (2010). Environmental chemicals targeting thyroid. *Hormones* **9**, 28-40.

TITLE: Mechanistic basis of the effects of an agroveterinary insecticide, the fipronil, and/or its metabolites on the thyroid function in rat

SUMMARY: The widely used insecticide fipronil is a thyroid disruptor in rat acting on thyroid hormone hepatic metabolism. In sheep, a more relevant species for the human thyroid regulation, fipronil-induced thyroid-disruption is much more limited. The goal of this thesis was to characterize the mode of action of fipronil on thyroid function at the hepatic level focusing on 1) the potential role of fipronil sulfone, the main fipronil metabolite formed *in vivo*, and on 2) interspecific differences in terms of fipronil metabolism and/or sensitivity to thyroid disruption that can prejudice of the relevance of the different animal models for the risk assessment of fipronil for human health. Fipronil sulfone was as efficient as fipronil to induce the expression and/or activity of enzymes involved in thyroid hormone or fipronil hepatic metabolism both *in vivo* in rat and *in vitro* on hepatocytes. The use of knock-out mice for xenosensors nuclear receptors strongly suggested an implication of the nuclear receptor Constitutive Androstane Receptor and/or Pregnane X Receptor on fipronil-induced thyroid disruption.

KEYWORDS: endocrine disruptor, fipronil, fipronil sulfone, thyroid function, hepatic metabolism, rat, transgenic mice, hepatocytes, Constitutive Androstane Receptor, Pregnane X Receptor

AUTEUR: Béatrice ROQUES

TITRE: Bases mécanistiques des effets d'un insecticide agrovétérinaire, le fipronil, et/ou de ses métabolites sur la fonction thyroïdienne chez le rat

DIRECTEURS DE THESE: Madame le Docteur Catherine VIGUIE
Monsieur le Docteur Pascal MARTIN

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE:

le 12 Décembre 2012 à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

RESUME: Le fipronil, insecticide largement utilisé, est un perturbateur thyroïdien chez le rat modulant le catabolisme hépatique des hormones thyroïdiennes. Ses effets chez le mouton, considéré comme un modèle plus pertinent que le rat pour étudier une régulation de la fonction thyroïdienne chez l'Homme, sont plus limités. Le but de cette thèse était de caractériser au niveau hépatique le mode d'action du fipronil sur la fonction thyroïdienne en s'intéressant 1) au rôle potentiel du principal métabolite du fipronil formé *in vivo*, le fipronil sulfone, et 2) aux différences interspécifiques de métabolisme du fipronil et/ou de sensibilité à la perturbation thyroïdienne qui peuvent préjuger de la pertinence des différents modèles animaux pour l'analyse du risque du fipronil pour la santé humaine. L'efficacité du fipronil sulfone à induire l'expression et/ou l'activité d'enzymes responsables du métabolisme hépatique des hormones thyroïdiennes ou du fipronil était la même que celle du fipronil autant *in vivo* chez le rat que *in vitro* sur hépatocytes. L'utilisation d'un modèle de souris déficientes pour des récepteurs nucléaires xénosenseurs suggérait fortement une implication des récepteurs nucléaires Constitutive Androstane Receptor et/ou Pregnane X Receptor dans la perturbation thyroïdienne induite par le fipronil.

MOTS-CLES: perturbateur endocrinien, fipronil, fipronil sulfone, fonction thyroïdienne, métabolisme hépatique, rat, souris transgéniques, hépatocytes, Constitutive Androstane Receptor, Pregnane X Receptor

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE: Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE:

UMR1331 TOXALIM, Research Centre in Food Toxicology, INRA-ENVT
Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
23, Chemin des Capelles - BP 87614
31076 TOULOUSE Cedex 3