

ANNÉE 2017

N° 023

THÈSE
pour le
DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

par

Davy GUIGNARD

Présentée et soutenue publiquement le 07/04/2017

**Evaluation toxicologique des propriétés perturbatrices
thyroïdiennes de contaminants environnementaux :
exemple du fipronil**

Président : M. Alain PINEAU, Professeur de Toxicologie

Membres du jury : Mme Elise VERRON, Maître de Conférences de Toxicologie
Mme Catherine VIGUIE, Directeur de Recherche INRA

Remerciements

A Monsieur Alain PINEAU, Professeur de Toxicologie à l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nantes,

Merci de me faire l'honneur de présider ce jury.

A Madame Elise VERRON, Maître de Conférences en Toxicologie à l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nantes,

Merci d'avoir accepté de m'encadrer au cours de cette thèse de pharmacie et de m'avoir guidé, tout au long de mes études jusqu'à aujourd'hui, dans mon orientation professionnelle.

A Madame Catherine VIGUIE, Directeur de Recherche au sein de l'UMR 1331 Toxalim – INRA / ENVT à Toulouse,

Merci d'avoir accepté de renouveler l'expérience des jurys de thèse (cette fois, c'est la dernière !). Je tiens à te remercier de m'avoir fait confiance lors du stage de master 2 : le début de 3 belles années.

A Béatrice,

Merci de m'avoir formé à la culture cellulaire, un monde très éloigné de celui « des animaux à 4 pattes » !

A ma famille,

Merci pour votre soutien infailible au cours de ces années d'étude, même dans les moments d'exams où je n'étais pas des plus agréables (il paraît !!!). Et oui, il est loin le premier emménagement dans la grande ville nantaise ! Je dis bien « premier » car je vous en ai quand même bien fait baver avec tous ces déménagements.

A mes amis de pharmacie,

Vous m'avez tant fait rire au cours de ces 6 belles années de pharmacie. Les bancs de la fac sont déjà loin mais les souvenirs restent impérissables. Je n'oublierai jamais ces quelques situations rocambolesques : Thomas et son pipeau « point très discret » ; Boris et son fameux « plus vite, plus vite » ; Camille et Claire, les reines de la « Biafine sous-marine » ; Maxime pris en flagrant délit de dessiner une lame histologique sans avoir allumé le microscope (et dire que ça va devenir biologiste !) ; Antoine et sa « zénitude éternelle » lors d'un exposé sur la grossesse !

A Jean-Max,

Une spéciale dédicace à mon binôme qui aura toujours été présent, du tutorat aux soirées BU les veilles d'exams, sans oublier les autres soirées moins studieuses... Comment oublier ce TP de chimie minérale, le lendemain d'une « dure mais bonne soirée » ? Ou encore ce dosage « inversé » de l'eau dans la Biafine (décidément que de souvenirs dans ce TP Biafine) !

Au quatuor infernal : Lucie, Cloélia, Tristan et Alexis

Tout simplement merci pour votre joie de vivre et votre soutien permanent (même face à mon humour parfois potache !)

A Anne,

Comment te remercier pour tout ce que tu m'as apporté durant ces années (et dire que j'ai osé critiqué ta prise de notes en galénique !) mais surtout ce que tu m'apportes encore tous les jours ! Qui aurait pu croire qu'un petit-suisse pouvait être le début d'une belle histoire ? Finalement, même si cela aura été légèrement retardé pour nous (tu étais trop pressée de t'échapper du grand amphi), M. Pouchus avait raison : il faut toujours regarder son voisinage dans l'amphi de 1^{ère} année...

Sommaire

I.	Introduction générale.....	11
II.	Les perturbateurs endocriniens : un challenge pour les toxicologues.....	13
A.	Définition.....	13
B.	Des effets à faibles doses	13
C.	Relation dose-réponse non-monotone	16
D.	Fenêtres critiques de sensibilité - Exposition périnatale.....	19
E.	Effets transgénérationnels	21
F.	Les effets "cocktail"	22
III.	Les perturbateurs thyroïdiens	25
A.	Mécanismes d'action des perturbateurs thyroïdiens	25
1.	Perturbation de la régulation centrale des hormones thyroïdiennes.....	26
2.	Perturbation de la synthèse des hormones thyroïdiennes.....	26
3.	Interaction avec les protéines sériques de liaison des hormones thyroïdiennes	27
4.	Perturbation des voies de désiodation	28
5.	Perturbation du métabolisme hépatique des hormones thyroïdiennes	30
6.	Perturbation du transfert intracellulaire des hormones thyroïdiennes.....	30
7.	Modulation de la liaison aux récepteurs des hormones thyroïdiennes.....	31
B.	Effets biologiques des perturbateurs thyroïdiens.....	33
IV.	Les modèles d'étude des perturbateurs thyroïdiens	39
A.	Modèles <i>in vitro</i>	39
B.	Modèles amphibiens et zebrafish	41
C.	Les modèles mammifères.....	44
1.	Chez l'adulte	44
2.	Chez le fœtus.....	45
V.	Exemple d'étude d'un perturbateur thyroïdien : le fipronil	49
A.	Présentations et principales utilisations du fipronil.....	49
B.	Données d'exposition humaine.....	49

C.	Données toxicologiques générales.....	52
D.	Effets sur la fonction thyroïdienne.....	52
E.	Problématique.....	54
F.	Objectifs.....	55
G.	Matériels et méthodes.....	56
1.	Origine et obtention des hépatocytes.....	56
2.	Origine et préparation des traitements.....	56
3.	Réactifs de culture.....	57
4.	Mise en culture des hépatocytes.....	57
5.	Evaluation de la clairance de la thyroxine.....	58
6.	Dosage du fipronil et du fipronil sulfone.....	59
7.	Etude de l'expression protéique en In Cell Western.....	59
8.	Evaluation de la viabilité cellulaire.....	60
H.	Résultats.....	61
1.	Pharmacodynamie comparative du fipronil et du fipronil sulfone sur le modèle d'hépatocytes de rat.....	61
2.	Biotransformation du fipronil en fipronil sulfone.....	64
3.	Différences interspécifiques de métabolisation du fipronil en fipronil sulfone.....	65
I.	Discussion et perspectives.....	68
1.	Pharmacodynamie comparative du fipronil et du fipronil sulfone sur la clairance de la thyroxine.....	68
2.	Pharmacodynamie comparative du fipronil et du fipronil sulfone sur l'expression de protéines hépatiques.....	69
3.	Comparaison inter-espèces des effets.....	70
VI.	Conclusion générale.....	73
VII.	Références.....	75

Liste des figures

Figure 1 : comparaison de coupes de glandes mammaires de singes femelles exposées in utero au contrôle (A) ou au BPA 400 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ (B).....	15
Figure 2 : exemples de courbes dose-réponse non-monotones.....	16
Figure 3 : poids moyen (\pm SEM) de la prostate (en mg) chez des souris mâles adultes exposées durant la période prénatale à l'œstradiol ou au diéthylstilbestrol.....	18
Figure 4 : schéma expliquant le risque de sous-estimation de l'effet si le composé décrit une courbe dose-réponse en U	18
Figure 5 : effet du développement périnatal sur la fraction de BPA non-conjugué (seule fraction biologiquement active) présent chez le rat aux stades fœtus, nouveau-né et adulte	20
Figure 6 : phénotype transgénérationnel après traitement de rates gestantes à la vinclozoline	22
Figure 7 : description des éléments clés de l'axe hypothalamo-hypophysaire-thyroïdien et les mécanismes d'action potentiels de perturbateurs thyroïdiens.....	25
Figure 8 : production des hormones thyroïdiennes par les follicules thyroïdiens.....	27
Figure 9 : structure chimique de la thyroxine et de xénobiotiques se liant à la transthyréthine.....	28
Figure 10 : structures et relations entre les principales hormones thyroïdiennes activées ou inactivées par les différentes désiodases.....	29
Figure 11 : schéma de la cascade de transduction activée par les hormones thyroïdiennes.....	32
Figure 12 : effets d'une hypothyroïdie congénitale sur le développement du cortex cérébelleux chez une souris à 12 jours post-natal.....	34
Figure 13 : diminution de la concentration sérique de T4 et altération de la différenciation des précurseurs des cellules gliales en oligodendrocytes exprimant le facteur MAPG (myelin-associated glycoprotein) ou en astrocytes exprimant le facteur GFAP (glial fibrillary acidic protein) dans le corps calleux de rats issus de mères traitées avec du propylthiouracil, un agent antithyroïdien.	35

Figure 14 : schéma récapitulant les effets de différents degrés d'insuffisance en hormones thyroïdiennes sur le développement du SNC observés chez l'Homme et l'animal	36
Figure 15 : induction de l'activité luciférase en réponse à une exposition des cellules GH3-TRE-Luc pendant 24 heures à la T3 et la T4	40
Figure 16 : : induction de l'activité luciférase en réponse à une exposition pendant 24 heures des cellules GH3-TRE-Luc au 4-OH-BDE-69 et au 4-OH-BDE-121.	40
Figure 17 : photos de larves de <i>Xenopus laevis</i> exposées pendant 9 – 15 ou 21 jours au contrôle, à la T4 (10^{-7} M) et/ou au BPA (10^{-5} M et $2,5 \times 10^{-5}$ M).....	42
Figure 18 : (A) culture de larves <i>Xenopus laevis</i> en plaque 96 puits. (B) observation microscopique de la fluorescence émise dans le système nerveux central et les branchies de larves génétiquement modifiées pour exprimer la GFP (Green Fluorescent Protein) lors de l'activation du promoteur des gènes cibles de la T3.....	43
Figure 19 : structure chimique du fipronil.....	49
Figure 20 : métabolisme du fipronil chez le rat. Les métabolites ont été identifiés par LC-MS/MS dans l'urine de rats traités par voie orale au ^{14}C -fipronil (10 mg/kg).....	51
Figure 21 : effet d'un traitement au fipronil ($3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ VO pendant 14 jours) sur la clairance de la thyroxine libre (graphes du haut) chez le rat (gauche) et le mouton (droite) et exposition interne (concentrations plasmatiques moyennes) au fipronil et son métabolite, le fipronil sulfone.....	54
Figure 22 : schéma physiopathologique de la perturbation thyroïdienne engendrée par un traitement au fipronil chez le rat.....	55
Figure 23 : observation microscopique d'une culture primaire d'hépatocytes de rat.....	57
Figure 24 : schéma du protocole expérimental suivi lors des essais de comparaisons inter-espèces de cinétique de T4 et d'expression des protéines du métabolisme hépatique	61
Figure 25 : effets des différents traitements sur la viabilité cellulaire évaluée par un test au MTT	61
Figure 26 : ajustement de la cinétique d'élimination de la T4 obtenue après exposition de cultures primaires d'hépatocytes de rat au fipronil $0.5 \mu\text{M}$	62

Figure 27 : ajustement de la clairance de T4 en fonction de la concentration en fipronil, obtenue sur des cultures primaires d'hépatocytes de rat.....	62
Figure 28 : effets d'un traitement au fipronil ou au fipronil sulfone (1 et 4 μ M) sur l'expression protéique des CYP3A sur des cultures primaires d'hépatocytes de rat.....	63
Figure 29 : évolution temporelle des concentrations extracellulaires de fipronil et de fipronil sulfone suite au traitement des hépatocytes au fipronil 0,5 μ M.....	64
Figure 30 : évolution temporelle des concentrations extracellulaires de fipronil sulfone suite au traitement des hépatocytes au fipronil sulfone 0,5 μ M	65
Figure 31 : concentration en fipronil et en fipronil sulfone dans le milieu extracellulaire 24 h après le traitement de cultures primaires d'hépatocytes de rat, de mouton et d'homme par des concentrations croissantes en fipronil	66
Figure 32 : résultats des tests de viabilité au MTT de cultures primaires d'hépatocytes de rat, de mouton et d'homme suite à l'incubation pendant 48 heures avec des concentrations croissantes de fipronil et de fipronil sulfone.....	67

Liste des tableaux

Tableau 1 : comparaison des concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes totales, des fractions libres et des temps de demi-vie des hormones thyroïdiennes chez l'Homme, le mouton, le rat et la souris 45

Tableau 2 : comparaison de la chronologie des principales phases de l'ontogénèse de la fonction thyroïdienne chez les espèces humaine, ovine et rat 47

Abréviations

- ADN : acide désoxyribonucléique
- Afssa : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
- Afsse : Agence Française de Sécurité Sanitaire Environnementale
- ARN : acide ribonucléique
- AUC : aire sous la courbe (area under the curve)
- BBP : butylbenzyl-phtalate
- BPA : bisphénol A
- CAR : Constitutive Androstane Receptor
- CHO : chinese hamster ovary
- CRF : corticotropin-releasing factor
- CYP450 : cytochrome P450
- DEHP : di(2-ethylhexyl)phtalate
- DES : diéthylstilbestrol
- DIDP : diisodecyl-phtalate
- DJA : dose journalière admissible
- DL50 : dose létale 50 %
- DMSO : diméthylsulfoxyde
- EC50 : concentration efficace 50 %
- EFSA : european food safety authority
- Emax : efficacité maximale
- EPA : environmental protection agency
- GD : gestational day
- GFAP : glial fibrillary acidic protein
- GFP : green fluorescent protein
- HAP : hydrocarbure aromatique polycyclique
- HCB : hexachlorobenzène
- HPLC/GC : chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse
- IgG : immunoglobuline G
- LAT : L-type amino acid transporter
- LMR : limite maximale de résidus
- LOAEL : lowest observed adverse effect level
- LOQ : limit of quantification

- MAG : myelin associated glycoprotein
- MBP : myelin basic protein
- MCT : monocarboxylate transporter
- N-CoR : nuclear receptor corepressor
- MTT : bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
- NIS : sodium-iodide symport
- NOAEL : no-observed adverse effect level
- NTCP : Na/Taurocholate Cotransporting Polypeptide
- OATP : organic anion transporting polypeptide
- OMC : octyl-méthoxycinnamate
- PBDE : polybromodiphényléther
- PCB : polychlorobiphényle
- PCR : polymerase chain reaction
- PK/PD : analyse pharmacocinétique / pharmacodynamique
- PND : post-natal day
- PPAR γ : peroxysome proliferator activated receptor
- PTU : propylthiouracil
- PXR : Pregnane X Receptor
- REEF : reproductive effects of environmental chemicals in females
- rT3 : reverse T3
- RXR : retinoid X receptor
- SMRT : silencing mediator for retinoid and thyroid receptors
- SNC : système nerveux central
- SULT : sulfotransférase
- SVF : sérum de veau foetal
- T2 : 3,3'-diiodothyronine
- T3 : triiodothyronine
- T4 : thyroxine
- TBBPA : tétrabromobisphénol A
- TBG : thyroxine-binding globulin
- TCDD : tétrachlorodibenzo-p-dioxine
- TPO : thyropéroxydase
- TR : thyroid hormone receptor
- TRE : thyroid hormone response element
- TSH : thyroid stimulating hormone

- TTR : transthyrétine
- UGT : UDP-glucuronosyltransférase
- VO : voie orale

I. Introduction générale

Comme en témoigne la récente interdiction en France du bisphénol A dans les conditionnements alimentaires et la forte médiatisation dont ils font l'objet, les perturbateurs endocriniens constituent une véritable problématique de santé publique actuelle. Cette classe de composés se retrouve aujourd'hui au cœur des enjeux politiques et économiques et suscite de nombreuses inquiétudes chez les consommateurs, en particulier chez les jeunes parents soucieux du bien-être de leur enfant. En effet, l'exposition périnatale à des perturbateurs endocriniens est suspectée d'être à l'origine, au moins en partie, de l'augmentation de l'incidence des troubles du comportement tels que l'autisme ou l'hyperactivité. Plus globalement, elle serait associée à une diminution des capacités cognitives chez l'enfant dont le coût sociétal serait estimée à plus de 150 milliards d'euros par an dans l'Union Européenne ¹.

Bien que les premières observations sur les perturbateurs endocriniens datent déjà de plus d'un demi-siècle, les débats sont encore très actifs au sein de la communauté scientifique, y compris sur la définition même des principes fondamentaux. La littérature scientifique s'accroît de jours en jours mais paradoxalement, la réglementation semble au point mort. En effet, les propriétés particulières de ces composés bousculent complètement le processus d'évaluation du risque classiquement utilisé et amènent les toxicologues à remanier les directives réglementaires.

La majorité des études sur les perturbateurs endocriniens s'est dans un premier temps focalisée sur la fonction de reproduction. Toutefois, la fonction thyroïdienne peut elle-aussi être la cible de polluants environnementaux. Cela a été particulièrement décrit pour les polybromodiphényléthers (PBDE), des retardateurs de flamme, ou encore les polychlorobiphényles (PCB), des composés utilisés autrefois dans les transformateurs mais détectés encore aujourd'hui chez l'Homme du fait de leur très forte persistance dans l'environnement. Néanmoins, de nombreux autres composés sont capables de moduler la fonction thyroïdienne. Ceci est d'autant plus problématique que les hormones thyroïdiennes contrôlent un grand nombre de processus métaboliques ainsi que le développement du système nerveux central fœtal.

Dans ces conditions, le manuscrit de thèse se propose de revenir sur les propriétés particulières des perturbateurs endocriniens et de détailler les challenges auxquels les agences réglementaires doivent faire face. Dans un second temps, il se focalisera sur les perturbateurs thyroïdiens en présentant les mécanismes d'action possibles et les conséquences de l'exposition humaine à ce type de composés. La troisième partie sera dédiée à la description des différents modèles d'études existant sur les

perturbateurs thyroïdiens. La dernière partie sera consacrée à la présentation d'une étude de toxicologie comparative d'espèces du fipronil, un composé utilisé comme produit phytosanitaire et médicament vétérinaire et présentant des propriétés perturbatrices thyroïdiennes.

II. Les perturbateurs endocriniens : un challenge pour les toxicologues

A. Définition

En 2003, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a défini comme perturbateur endocrinien « une substance ou un mélange exogène altérant les fonctions du système endocrinien et induisant donc des effets nocifs sur la santé d'un organisme intact, de ses descendants ou (sous-)populations ». Bien que la définition de l'OMS prévale aujourd'hui comme référence, il n'existe pas de véritable consensus autour de cette définition comme en atteste les nombreuses autres propositions établies par différents groupes scientifiques. Ainsi, alors que la définition de l'OMS repose sur la mise en évidence conjointe d'un mécanisme d'action ET d'un effet délétère, pour l'EPA (Environmental Protection Agency) et la Société d'Endocrinologie, seule la démonstration du mécanisme d'action est nécessaire pour considérer une substance comme perturbateur endocrinien. En effet, ces derniers considèrent qu'une altération du mécanisme est forcément associée à un effet délétère.

Si ce désaccord semble futile au premier abord, il reflète en réalité un vaste flou scientifique et réglementaire autour des perturbateurs endocriniens. Pour preuve, seuls quelques tests reconnus réglementairement sont véritablement dédiés à l'étude des perturbateurs endocriniens. On peut notamment citer le test utéro-trophique basé sur la détection des substances œstrogénomimétiques via la mesure du poids utérin. Pourtant, les perturbateurs endocriniens présentent des propriétés (spécifiques ou non de cette classe de composés) ne permettant pas nécessairement d'appliquer les principes fondamentaux des tests de toxicologie réglementaire. Ils représentent un véritable challenge pour les toxicologues, les amenant à revoir les approches classiquement utilisées lors de l'évaluation toxicologique d'une substance.

B. Des effets à faibles doses

Au même titre que les hormones endogènes sont biologiquement actives à de très faibles concentrations (ng/mL voire pg/mL), les perturbateurs endocriniens induiraient des effets biologiques à de faibles doses.

Selon la définition du « National Toxicology Program » (2001), on entend par effet à faible dose toute modification biologique se produisant (1) pour des doses d'exposition comparables à celles décrites

chez l'Homme (exposition interne ou externe) ou (2) pour une dose inférieure aux doses classiquement utilisées dans les tests de toxicologie ². Une dose inférieure à la LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level) ou la NOAEL (No-Observed Adverse Effect Level), est ainsi considérée comme faible.

Bien que plusieurs exemples de perturbateurs endocriniens associés à des effets à faibles doses aient été mis en évidence, cette propriété est sujette à de nombreuses discordes. Le bisphénol A (BPA) constitue sans doute un des exemples de perturbateurs endocriniens pour lesquels les effets à faibles doses sont les plus controversés. Le BPA est un monomère utilisé dans la fabrication de polycarbonates et de résines époxydes. Il est produit à grande échelle à travers le monde et entre notamment dans la composition de conditionnements alimentaires, de composites dentaires, de peintures...

Le BPA a fait l'objet de nombreuses études toxicologiques, notamment en raison de ses propriétés estrogénomimétiques. Sur la base d'études jugées acceptables réglementairement, l'EFSA (European Food Safety Authority) a fixé la NOAEL du BPA à $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ ³. Pourtant, plusieurs études animales ont mis en évidence des altérations de la glande mammaire à des doses de BPA inférieures à la NOAEL (No-Observed-Adverse-Effect Level). Ainsi, chez le singe, l'exposition prénatale à une dose de $400 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ (voie orale), conduisant à des concentrations sanguines de BPA comparables à celles observées chez l'Homme, entraîne un développement accéléré de la glande mammaire à la naissance (Figure 1) ⁴. Chez la souris, l'exposition prénatale (8-18^{ème} jours de gestation) à une dose de $0,25 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ par voie sous-cutanée entraîne des altérations tissulaires de la glande mammaire au 18^{ème} jour de gestation ⁵. Une augmentation de l'aire ductale et des modifications de la localisation du collagène ont été observées. Dans une autre étude, le transcriptome de l'épithélium ductal et du stroma périductal a été modifié chez des souris exposées *in utero* à $250 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ de BPA. Certaines altérations du transcriptome étaient comparables à celles retrouvées chez des souris exposées à l'œstradiol ($10 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$) ⁶.

On note donc un véritable fossé entre les observations obtenues expérimentalement et les avis émis par les agences réglementaires.

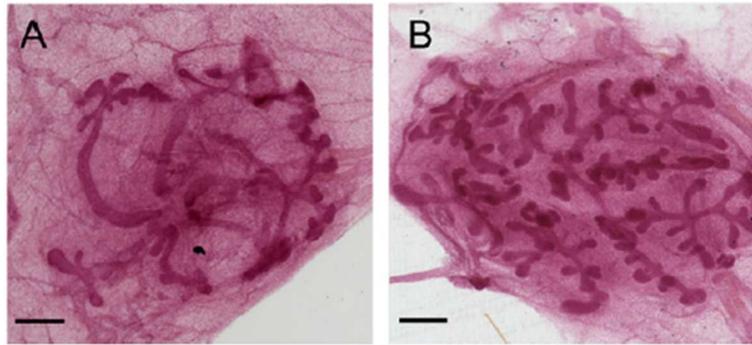


Figure 1 : comparaison de coupes de glandes mammaires de singes femelles exposées in utero au contrôle (A) ou au BPA 400 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ (B). On note que l'architecture de la glande mammaire est plus complexe chez les animaux exposés au BPA, avec notamment un nombre de bourgeons plus élevé ⁴.

L'exemple du bisphénol A met particulièrement en avant deux points critiques dans le processus actuel d'évaluation des effets à faibles doses.

D'une part, *les tests classiquement utilisés en toxicologie réglementaire sont-ils adaptés à la détection de fines modifications biologiques ?* En effet, la modulation par des perturbateurs endocriniens de certains paramètres biologiques est susceptible d'échapper à la batterie de tests exigés réglementairement. Pour exemple, alors que l'exposition prénatale au bisphénol A induit chez l'animal de subtiles modifications de l'architecture de la glande mammaire sans malformation macroscopique, la ligne directrice du test de toxicité pour la reproduction sur deux générations (n°416 OCDE) recommande seulement de mener une analyse histopathologique des organes de la fonction de reproduction sur les descendants présentant des anomalies macroscopiques.

Dans ces conditions, il semble nécessaire d'élaborer de nouvelles directives et de développer de nouveaux tests. Ces derniers doivent être à la fois sensibles et robustes pour pallier au manque de reproductibilité des études à faible dose décrit par certains auteurs ⁷⁻⁹. Les effets à faibles doses sont généralement subtils et nécessitent de parfaitement maîtriser certains facteurs. Ainsi, l'absence de contamination du milieu de culture ou de la nourriture doit être vérifiée ¹⁰. De même, le choix du modèle utilisé doit être mûrement réfléchi : certaines souches de rat et de souris présentent par exemple une insensibilité naturelle aux effets œstrogéniques ^{5,11}.

D'autre part, *doit-on considérer toute modification biologique comme potentiellement délétère ?* En effet, bien que le terme d'effet délétère ait été défini par l'OMS (2009), les critères s'appliquant spécifiquement aux perturbateurs endocriniens n'ont pas été clairement établis. Il est alors souvent bien difficile de différencier une adaptation biologique d'un véritable effet délétère. Ainsi, la toxicité

des effets observés dans les études (ex: altérations des concentrations circulantes de testostérone, modification de la distance anogénitale, altération du dimorphisme sexuel du comportement...) est souvent jugée différemment entre des scientifiques de champs disciplinaires différents (toxicologue, biologiste spécialiste du développement, endocrinologue...) ^{12,13}. Tandis que pour certains auteurs, beaucoup d'effets sont réversibles et reflètent davantage un phénomène d'adaptation qu'un effet délétère ⁸, pour d'autres, il est fortement probable qu'un organisme, en particulier lors de périodes d'exposition critiques telles que la vie embryonnaire, ne soit pas suffisamment développé pour maintenir son homéostasie et s'adapter à un déficit ou un excès hormonal ¹⁴.

Pour exemple, il est fort probable que la modification de l'histologie de la glande mammaire observée chez les descendants d'animaux exposés au BPA puisse altérer la fonction même de la glande et soit alors reliée à un effet toxique. En revanche, relier les modulations du transcriptome de la glande mammaire à un effet véritable délétère semble beaucoup plus incertain.

C. Relation dose-réponse non-monotone

Bien que contestés par certains scientifiques, de nombreux exemples de relations dose-réponse non-monotones ont été décrites. On parle de relation dose non-monotone lorsque la pente de la courbe dose-réponse change de signe sur un domaine de concentrations testées ¹⁵. Les courbes en U et en U-inversé (ou en cloche) sont les plus fréquemment décrites mais des relations plus complexes peuvent exister.

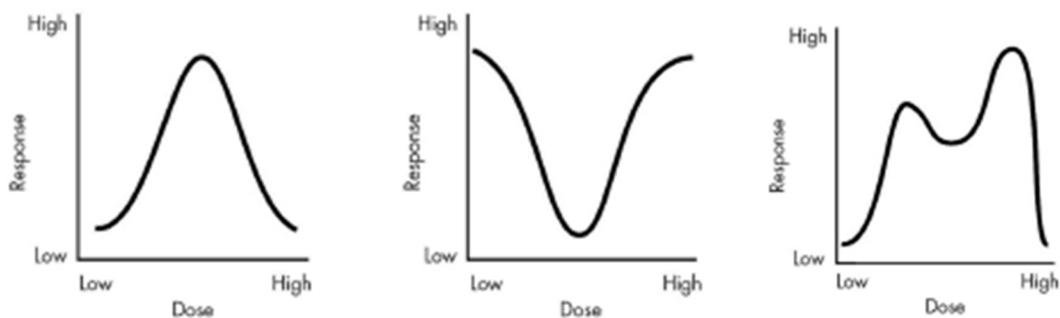


Figure 2 : exemples de courbes dose-réponse non-monotones ¹¹

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer le fait que les perturbateurs endocriniens puissent engendrer ce type de relation dose-effet.

D'une part, ces relations peuvent provenir des différents mécanismes de rétrocontrôles négatifs régulant les axes endocriniens. En effet, on peut imaginer que le rétrocontrôle négatif ne soit levé qu'à partir d'un certain niveau de dérégulation de la fonction. Ainsi, à faible dose, la modulation engendrée n'est pas suffisante pour déclencher le rétrocontrôle laissant alors apparaître l'effet biologique. A une dose légèrement plus élevée, le rétrocontrôle est activé et permet de compenser les altérations. Puis, à une dose encore plus élevée, le rétrocontrôle n'est plus suffisant pour pallier la dérégulation hormonale.

D'autre part, les relations non-monotones peuvent apparaître dans un contexte de cytotoxicité à fortes doses. Ainsi, sur des cellules MCF-7 de cancer mammaire, l'œstradiol augmente la prolifération cellulaire à faible dose tandis qu'à forte dose, l'hormone est cytotoxique et diminue le nombre de cellules ¹⁰.

Par ailleurs, ce type de relation dose-réponse peut également être issu de l'activation par une hormone endogène ou un perturbateur endocrinien de 2 voies de signalisation distinctes, ces dernières possédant des sensibilités différentes mais interférant avec la même voie physiopathologique. Pour exemple, l'utérus exprime les récepteurs œstrogéniques alpha et bêta dont l'activation conduit à des effets opposés. L'activation par l'œstrogène de l'isoforme alpha stimule la prolifération cellulaire tandis que l'isoforme bêta induit l'apoptose.

L'activation de plusieurs familles de récepteurs hormonaux peut également se produire. En effet, à forte dose, une hormone ou un perturbateur endocrinien peut perdre sa spécificité et se lier à de multiples familles de récepteurs ¹¹. Ce type de mécanisme a été supposé pour décrire l'effet non-monotone sur le développement prostatique de l'œstradiol et du diéthylstilbestrol (DES), un œstrogénomimétique puissant ¹⁶. Chez des souris mâles adultes exposées durant la période prénatale à différentes concentrations d'œstradiol, le poids de la prostate augmentait pour les faibles doses d'exposition et diminuait à fortes doses. Un profil similaire a été observé suite à l'exposition au DES (Figure 3). Cette courbe en U inversé pourrait provenir de la capacité de l'œstradiol (et probablement du DES) de se lier, à fortes doses, à d'autres récepteurs (ex : les récepteurs androgéniques) qu'à ses récepteurs spécifiques entraînant globalement un effet antagoniste sur le poids de la prostate.

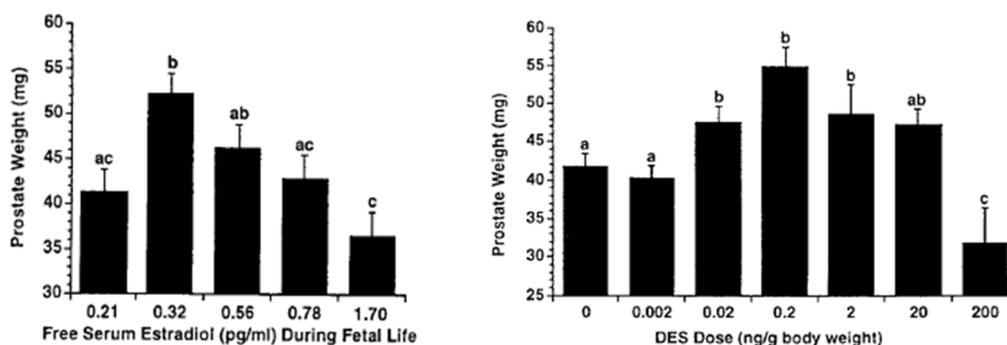


Figure 3 : poids moyen (\pm SEM) de la prostate (en mg) chez des souris mâles adultes exposées durant la période prénatale à l'œstradiol (graphe de gauche) ou au diéthylstilbestrol (DES ; graphe de droite) ¹⁶

Des phénomènes de compétition entre l'hormone endogène et le perturbateur endocrinien pour le récepteur peuvent aussi expliquer ce type de relation. La réponse biologique à un perturbateur endocrinien a ainsi été modélisée mathématiquement en prenant en compte la liaison de l'hormone et du xénobiotique à son récepteur, la liaison du récepteur au domaine de l'ADN, la liaison du complexe à des co-activateurs / co-répresseurs et la réponse biologique en absence du composé. Le modèle prédisait une réponse en U lorsque la concentration hormonale basale ne saturait pas les sites de liaison au récepteur ¹⁵.

D'un point de vue réglementaire, les relations dose-réponse non-monotones constituent un véritable obstacle à l'évaluation toxicologique. En effet, cette dernière repose sur le principe fondamental que l'effet est linéaire avec la dose, ce qui permet de déterminer arbitrairement une DJA (dose journalière admissible) à partir de la dose sans effet (NOAEL ou LOAEL) via l'application de facteurs de sécurité. Cependant, si le composé présente une dose-réponse en U, des effets biologiques peuvent apparaître pour des doses inférieures à la DJA (Figure 4).

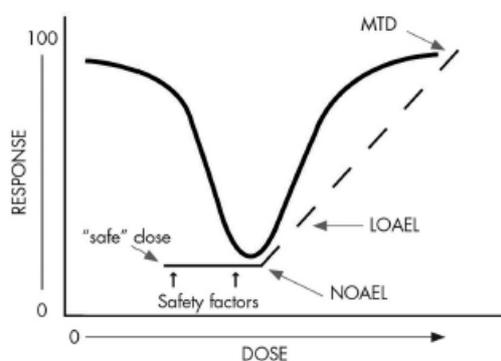


Figure 4 : schéma expliquant le risque de sous-estimation de l'effet si le composé décrit une courbe dose-réponse en U. Dans les tests traditionnels de toxicologie, des doses élevées sont testées pour identifier la dose maximale tolérée (MTD), la LOAEL et la NOAEL. Des facteurs de sécurité sont appliqués pour définir la dose de référence (dose pour laquelle l'exposition est présumée sans risque). Cette dose de référence est rarement testée directement. Pourtant, dans le cas d'une relation non-monotone, des effets délétères peuvent être observés à cette dose ¹¹

Pour mieux caractériser la relation dose-réponse, il est donc proposé de tester plus de doses^{10,12,17,18}. Ainsi, les agences réglementaires estiment qu'un minimum de 5 doses devrait être testé pour véritablement mettre en évidence une relation non-monotone. Par ailleurs, il est recommandé de tester la dose à laquelle l'Homme est exposé. Cette proposition soulève toutefois un problème pour les nouveaux composés dont l'exposition humaine est encore inconnue avant leur autorisation.

D. Fenêtres critiques de sensibilité - Exposition périnatale

Une des difficultés propre à l'étude des perturbateurs endocriniens réside dans l'association fréquente de ces xénobiotiques avec des fenêtres critiques de sensibilité. En effet, leurs effets ne se manifestent pas de façon similaire, quantitativement et qualitativement, au cours de la vie. L'absence d'effet à un stade donné ne garantit pas de l'innocuité de ce composé à une autre période de développement.

La période périnatale est aujourd'hui au cœur des préoccupations de santé. En effet, la barrière placentaire n'est malheureusement pas complètement imperméable et de nombreux composés chimiques peuvent la franchir¹⁹⁻²¹. Ceci est notamment vrai chez l'Homme du fait de sa placentation conduisant à une très forte intimité entre les circulations maternelle et fœtale. Ce passage transplacentaire est étudié avec attention puisque la période périnatale représente une période d'extrême sensibilité aux perturbateurs endocriniens. En effet, alors que chez l'adulte, les effets sont généralement réversibles (effets « activationnels »), une exposition périnatale (*i.e.* durant l'embryogénèse, l'organogénèse et le développement post-natal) peut conduire à des altérations persistantes. Ces effets sont dits « organisationnels ». Ils peuvent être visibles directement et se maintenir toute la vie, mais peuvent aussi être indétectables à la naissance et n'apparaître qu'ultérieurement²².

Le fœtus est particulièrement sensible à une perturbation endocrinienne car un grand nombre d'étapes clés du développement est directement régulé par les hormones circulantes. Ces dernières contrôlent notamment la prolifération, la différenciation, la croissance cellulaire ou l'apoptose^{10,23}. Le bon déroulement de ces événements nécessite que les concentrations hormonales soient finement contrôlées. Une modification même minime de ces concentrations est donc susceptible d'altérer le développement normal, d'autant que les systèmes endocriniens fœtaux ne sont pas suffisamment matures pour compenser ces modulations¹⁴.

La sensibilité accrue du fœtus et du nouveau-né aux perturbateurs endocriniens est aussi due à ses capacités de biotransformation limitées. L'exposition du fœtus aux xénobiotiques peut ainsi être prolongée par rapport à l'adulte^{10,24}. Pour exemple, sur le modèle de fœtus ovins, l'activité des

enzymes hépatiques responsables de la conjugaison du bisphénol A (sa principale voie de métabolisation) est relativement faible en début de gestation par rapport aux activités mesurées chez la brebis adulte ²⁵, de façon très similaire à ce qui est décrit chez l'Homme. Chez les rongeurs cette situation est encore plus accentuée car le nouveau-né est quasiment dépourvu de capacité de glucuroconjugaison du BPA (Figure 5) ^{26,27}. Pour certains composés, l'exposition fœtale peut également être facilitée par une diminution de la clairance maternelle en raison des modifications pharmacocinétiques liées à la grossesse ¹⁰. L'activité de cytochromes P450 hépatiques est par exemple modulée au cours de la grossesse chez la femme : l'activité des CYP2D6 et CYP3A4 est augmentée tandis que celle du CYP2D6 est diminuée ²⁸.

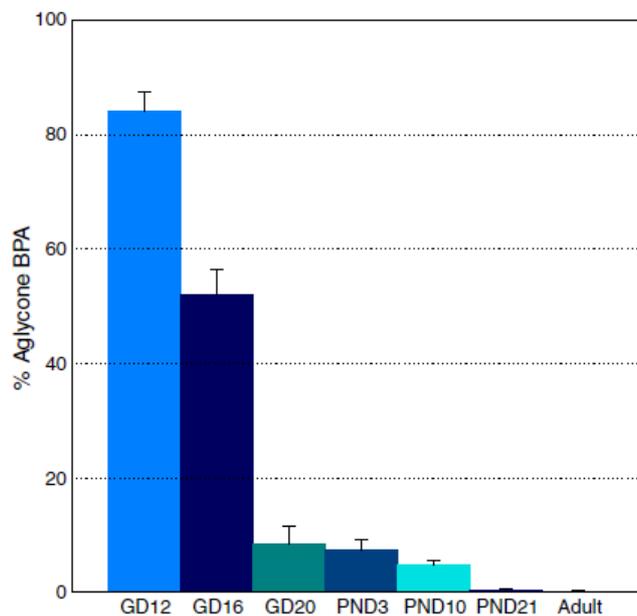


Figure 5 : effet du développement périnatal sur la fraction de BPA non-conjugué (seule fraction biologiquement active) présent chez le rat aux stades fœtus, nouveau-né et adulte. Les valeurs représentent la fraction moyenne (\pm SD) de BPA non-conjugué par rapport au BPA total (BPA-non-conjugué et principaux métabolites du BPA formés sous l'action des enzymes hépatiques de phase II) aux 12^{ème}, 16^{ème} et 20^{ème} jours de gestation, aux 3^{ème} et 10^{ème} jours post-natal et au stade adulte, suite à l'administration orale de BPA non-conjugué ²⁶

Le diéthylstilbestrol (DES) constitue un des plus tristes exemples de perturbateur endocrinien présentant des effets à long terme suite à une exposition prénatale. Ce composé est un puissant œstrogénomimétique. Au milieu du 20^{ème} siècle, le DES a été prescrit à de nombreuses femmes enceintes faisant des fausses couches répétées. Ce médicament a été interdit en 1977 en France suite à la mise en évidence d'un grand nombre de troubles de l'appareil reproducteur chez les filles des mères traitées. Ainsi, l'exposition *in utero* a été associée à une forte augmentation de l'incidence d'adénocarcinome du vagin ou de l'utérus chez des femmes jeunes ainsi qu'à des troubles de la fertilité. Les effets étaient moins importants chez les garçons bien que dans certains cas, une

augmentation de l'incidence de cryptorchidie et d'oligospermie ont été rapportés ²⁹⁻³¹. Chez les femmes traitées par le DES, le traitement n'induisait pas d'adénocarcinome vaginal et augmentait de façon moins importante le risque de développer un cancer du sein ³¹, soulignant une nouvelle fois l'association des perturbateurs endocriniens à des fenêtres spécifiques de sensibilité.

L'exposition périnatale à des composés chimiques et particulièrement à des perturbateurs endocriniens est suspectée d'être l'une des causes de l'augmentation de l'incidence des troubles comportementaux tels que l'hyperactivité et l'autisme ³². En Californie, une étude épidémiologique a été menée sur une cohorte comparant 465 enfants souffrant de troubles autistiques à 6975 enfants sains ³³. Les résultats suggéraient que le risque de survenue des troubles était d'autant plus élevé que le lieu d'habitation de la mère durant la grossesse était proche de zones d'application de pesticides. La confrontation des résultats de 21 publications semble conforter le lien entre exposition périnatale à des perturbateurs endocriniens et apparition de troubles comportementaux ²³. Ainsi, l'exposition à des pesticides organochlorés et au BPA serait positivement associée à la survenue de troubles autistiques. Les syndromes d'hyperactivité seraient augmentés chez les enfants exposés *in utero* aux PCB (polychlorobiphényles) ou à certains pesticides (dialkylphosphate, chlorpyrifos).

E. Effets transgénérationnels

Les effets transgénérationnels des perturbateurs endocriniens constituent une difficulté supplémentaire à l'étude de ces composés. En effet, suite à l'exposition prénatale d'un individu à un perturbateur endocrinien, les effets peuvent être observables non seulement chez ces individus mais également chez les générations suivantes, sans même que ces dernières n'aient été directement exposées au composé.

Cette propriété est malheureusement retrouvée pour le DES. En effet, les récentes études épidémiologiques suggèrent une augmentation du risque d'hypospadias chez les fils des femmes exposées *in utero* au DES ^{31,34,35}. Chez les filles, un nombre important de cancers ovariens et d'anomalies congénitales a également été observée ^{36,37}.

Sur le plan mécanistique, les modifications épigénétiques constituent aujourd'hui la piste privilégiée pour expliquer ces effets transgénérationnels. En effet, alors que les perturbateurs endocriniens ne produisent généralement pas de mutations génétiques, ils peuvent induire des modifications épigénétiques (méthylations de l'ADN, modifications d'histones, altérations de la structure de la chromatine...), notamment au niveau de la lignée germinale ³⁸. Ces modifications se transmettent alors de générations en générations : on parle d'héritage épigénétique transgénérationnel.

Ce mécanisme a été décrit pour la première fois avec la vinclozoline (un pesticide anti-androgène) ³⁹. L'exposition gestationnelle de rates (génération F0) entraînait une diminution de la fertilité et de la production spermatique ainsi qu'une augmentation de l'apoptose de cellules germinales chez les descendants mâles des générations F1 à F4 (Figure 6). Ces anomalies étaient corrélées à des modifications épigénétiques de la région promotrice de gènes exprimées dans les cellules germinales mâles.

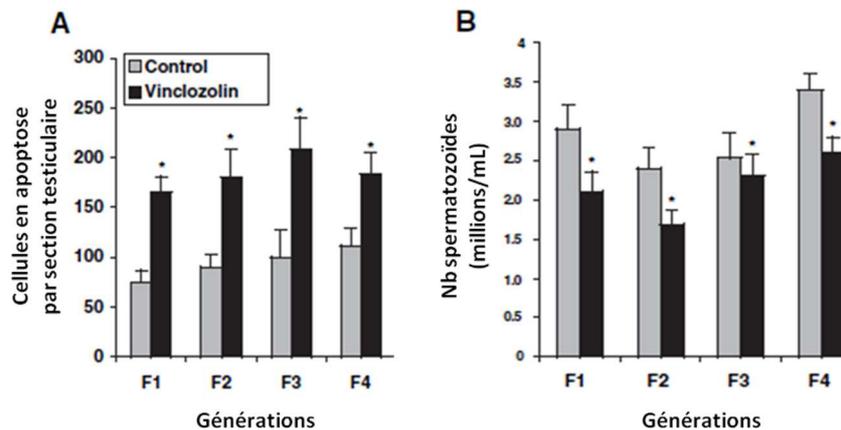


Figure 6 : phénotype transgénérationnel après traitement de rates gestantes (F0) à la vinclozoline. (A) apoptose de cellules germinales mâles et (B) densité spermatique chez les descendants mâles des générations F1, F2, F3 et F4 ³⁹

Des études récentes ont mis en évidence des effets transgénérationnels à des faibles doses de BPA. Ainsi, suite au traitement au BPA de souris gestantes du 11^{ème} au dernier jour de gestation, les femelles de la génération F3 présentaient un retard de l'ouverture vaginale et une diminution de la fertilité pour une dose de $0,5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ ⁴⁰. Au sein de la génération F2, l'expression dans les ovaires du gène *BCI2* codant pour un facteur anti-apoptotique et régulé par les œstrogènes était diminuée à 4 jours post-natal chez les animaux traités à une doses de $0,5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ ⁴¹. A 21 jours post-natal, les animaux du même groupe présentaient une diminution du pourcentage de follicules primaires et une augmentation du pourcentage de follicules secondaires.

F. Les effets "cocktail"

Les effets « mélange » ou « cocktail » constituent une véritable faiblesse du processus actuel d'évaluation du risque. Bien que cette problématique ne soit pas spécifique aux perturbateurs endocriniens, cette classe constitue un bon exemple de casse-tête pour les agences réglementaires. En effet, l'Homme est exposé quotidiennement à un grand nombre de perturbateurs endocriniens. Aujourd'hui, ces derniers sont testés individuellement. Pourtant, la combinaison de plusieurs

composés peut donner lieu à des effets additifs, inhibiteurs ou synergiques. Différentes stratégies d'études ont été développées pour mieux caractériser ces effets mélanges mais aucune ligne directrice n'est disponible réglementairement.

Une des solutions proposées est de prédire *in silico* les effets d'un mélange de composés à partir des paramètres pharmacodynamiques définis pour chaque composé individuellement : constantes d'affinité du composé chimique et de l'hormone endogène pour les récepteurs hormonaux ; paramètres de la relation dose-réponse.... Cette approche a notamment été utilisée pour comprendre les effets cumulatifs du mancozeb (fongicide) et de l'imidaclopride (insecticide) sur le métabolisme lipidique *via* leurs liaisons aux récepteurs thyroïdiens et/ou PPAR γ (peroxysome proliferator-activated receptors)⁴².

Une autre possibilité consiste à tester en premier lieu les composés seuls puis d'étudier dans un second temps différentes combinaisons de ces composés. En raison du caractère exponentiel du nombre de combinaisons possibles, ce type d'approche est généralement réalisé *in vitro*. Très souvent, une modélisation mathématique est menée en aval pour déterminer si la co-exposition conduit à des effets additifs, synergiques ou inhibiteurs, en particulier à des niveaux de concentrations comparables à ceux décrits chez l'Homme. Cette technique a permis de montrer, sur un modèle cellulaire sensible aux androgéno-mimétiques, que le parabène butyle, l'hydroxyanisole butyle et l'hydroxytoluène butyle n'induisaient pas de réponse seuls ou en mélange mais qu'en présence de dihydrotestostérone, les mélanges binaires avaient un effet anti-androgène⁴³.

Depuis quelques années, les études dites "real-life" se développent également. Celles-ci consistent à tester directement les effets d'un mélange très complexe de xénobiotiques contenus dans une matrice naturelle (ex : boues d'épuration). Cette approche est très pertinente puisque le mélange reflète au mieux l'ensemble des composés auxquels l'Homme est exposé. En revanche, la difficulté de ce type d'approche réside dans la complexité voire l'impossibilité d'identifier par la suite les composés responsables de l'effet observé. Le récent projet européen REEF (Reproductive Effects of Environmental chemicals in Females) constitue un exemple d'étude "real-life". Des brebis gestantes ont été exposées à un mélange de xénobiotiques, lors de différentes périodes de la gestation (début, milieu et fin), en pâturant dans des prés fertilisés par des boues d'épuration contenant notamment des hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAP), des polychlorobiphényles (PCB), des éthers de polybromodiphényles (PBDE) et du bis(2-éthylhexyl)phtalate (DEHP)⁴⁴. Cette exposition induisait, en fonction de la période d'exposition, des modifications des concentrations fœtales de testostérone et d'hormones thyroïdiennes ainsi qu'une réduction du nombre de follicules post-primordiaux sains.

A ces interactions d'ordre pharmacodynamique, il faut ajouter la possibilité de faire apparaître des interactions d'ordre pharmacocinétique. En effet, les paramètres pharmacocinétiques d'un composé peuvent être modifiés lors de l'addition d'un autre composé. Pour exemple, le BPA est principalement métabolisé en BPA-glucuronide (biologiquement inactif) via des enzymes de glucuroconjugaison (UGT2B15 et 2B7 chez l'Homme ^{45,46}). Il est probable que des analogues du BPA tels que le bisphénol S soient eux-aussi pris en charge par les mêmes isoformes. Des phénomènes de compétition pourraient alors apparaître et conduire à une augmentation des concentrations en molécules parents et donc d'une augmentation de la toxicité. Néanmoins, compte-tenu des faibles concentrations des perturbateurs endocriniens circulant généralement dans l'organisme, il semble peu probable que des phénomènes de saturation enzymatique puissent avoir lieu.

Pour conclure, on note que les perturbateurs endocriniens présentent, spécifiquement ou en commun avec d'autres classes de composés, des propriétés particulières nécessitant une actualisation des outils d'évaluation toxicologique. Un travail de fond doit donc être mené pour standardiser les lignes de conduite et développer de nouveaux tests. L'harmonisation de la réglementation autour des perturbateurs endocriniens s'avère toutefois d'autant plus compliquée que ces composés appartiennent à des domaines d'activités très différents (insecticides, herbicides, plastifiants, détergents, retardateurs de flamme, résines, excipients dans les produits de soins personnels...).

III. Les perturbateurs thyroïdiens

La majorité des travaux menés sur les perturbateurs endocriniens se sont concentrés sur la fonction de reproduction. Néanmoins, la fonction thyroïdienne constitue également la cible de certains xénobiotiques (contaminants environnementaux, médicaments...) auxquels l'Homme est exposé. Cette partie décrit les principaux mécanismes d'action des perturbateurs thyroïdiens en s'appuyant sur différents exemples décrits dans la littérature et détaille les conséquences possibles de l'exposition humaine à ce type de composés.

A. Mécanismes d'action des perturbateurs thyroïdiens

Les perturbateurs thyroïdiens peuvent modifier l'homéostasie thyroïdienne en agissant à différents niveaux de la régulation thyroïdienne (Figure 7).

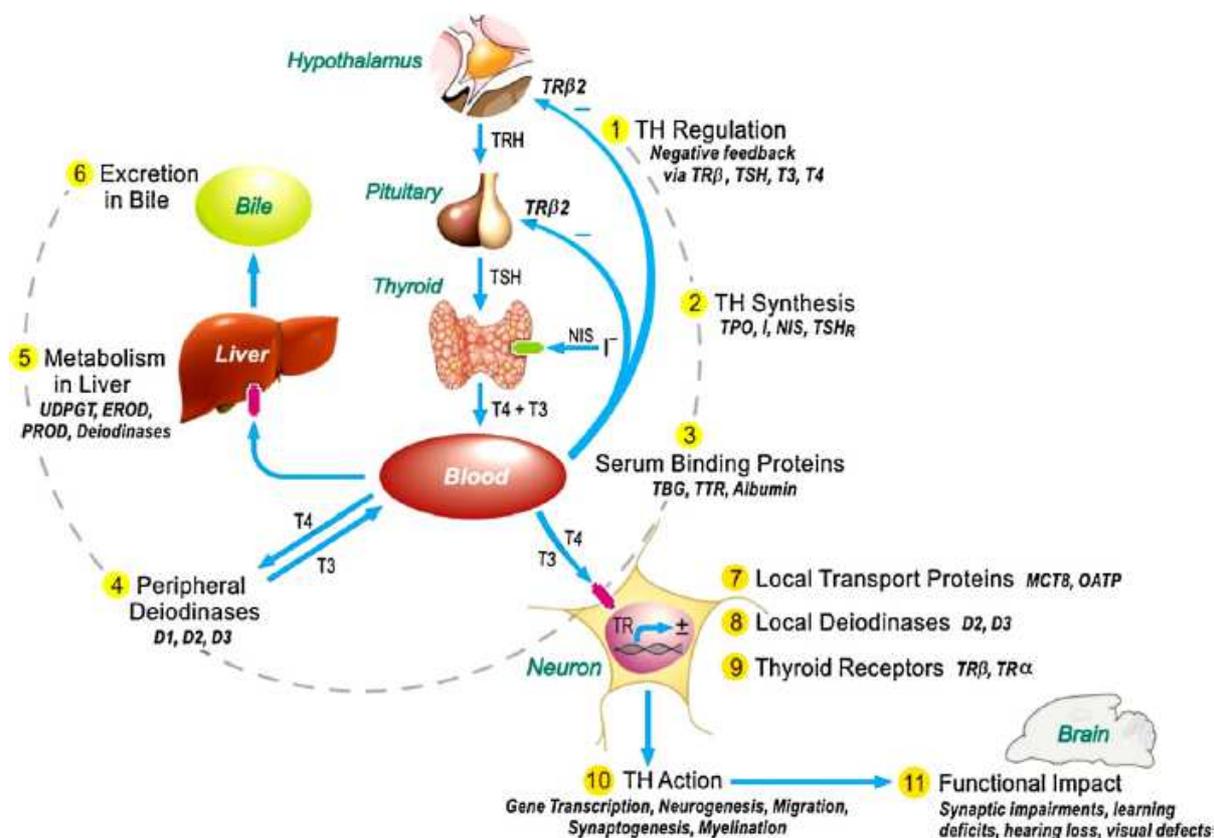


Figure 7 : description des éléments clés de l'axe hypothalamo-hypophysaire-thyroïdien et les mécanismes d'action potentiels de perturbateurs thyroïdiens ⁴⁷

1. Perturbation de la régulation centrale des hormones thyroïdiennes

Au vu de la littérature, peu de xénobiotiques semblent perturber directement la régulation centrale de l'axe thyroïdien, c'est-à-dire agir au niveau de l'étage hypothalamo-hypophysaire⁴⁸. Ces propriétés sont majoritairement retrouvées pour des agents pharmacologiques tels que les analogues de la somatostatine ou encore les rétinoïdes de synthèse (rétinoïdes sélectifs des RXR, Retinoid X Receptor). Ces derniers semblent moduler l'activité des cellules thyrotropes puisqu'ils diminuent *in vitro* le niveau d'expression des ARNm TSH β sans modifier l'expression des ARNm TRH⁴⁹. Des modulations de la régulation thyroïdienne centrale ont toutefois également été observées avec certains polluants environnementaux. Ainsi, à fortes doses, le tétrabromobisphénol A (TBBPA ; 2,1 g/kg ; SC) et la tributyltine (un anti-salissure de la famille des tributylétains ; 40 mg/kg; VO) diminuent l'activité du promoteur du gène *Trh* au sein de l'hypothalamus de rats issus de mères exposées durant la lactation⁵⁰. Il est néanmoins difficile de préciser si la diminution observée résulte d'une action directe des xénobiotiques sur l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien ou par un mécanisme indirect d'agonisme des hormones thyroïdiennes dans un contexte de rétrocontrôle.

2. Perturbation de la synthèse des hormones thyroïdiennes

Certains composés inhibent la synthèse des principales hormones thyroïdiennes, la thyroxine (T4) et la triiodothyronine (T3), en bloquant le transporteur NIS (Na/I Symport) chargé de l'absorption des ions iodure par les cellules folliculaires thyroïdiennes (Figure 8). C'est notamment par ce mécanisme qu'agissent le perchlorate (1 μ M) et les thiocyanates (10 μ M), des molécules fréquemment utilisées dans les modèles animaux d'hypothyroïdie⁵¹. Certains phtalates tels que le DIDP (Diisodecyl phtalate) et le BBP (butylbenzyl phtalate) altèrent aussi l'activité des NIS *in vitro* à une concentration de 1 mM⁵².

D'autres composés agissent en bloquant la thyroperoxydase (TPO). Cette enzyme catalyse la première étape de la synthèse des hormones thyroïdiennes en permettant l'organification de l'iode et l'iodation des résidus tyrosine de la thyroglobuline aboutissant à la formation de monoiodotyrosine et de diiodotyrosine (Figure 8). Le propylthiouracile et le méthimazole, deux puissants antithyroïdiens utilisés chez l'Homme pour traiter l'hyperthyroïdie et couramment chez les animaux comme référence dans les tests de toxicologie, bloquent l'activité de la TPO à des doses de l'ordre du μ M⁴⁸. L'inhibition de la TPO a également été décrite pour certains fongicides comme le mancozeb⁵³ et l'éthylèneéthiourée⁵⁴, des herbicides comme l'amitrol, des protecteurs UV utilisés en cosmétologie tels que la benzophénone⁵⁵ ou encore pour des composés naturels tels que les composés isothiocyanates naturellement présents dans beaucoup de crucifères cultivées, en particulier le chou⁵³.

L'hypothyroïdie pouvant apparaître lors d'un traitement à l'amiodarone (anti-arythmique) proviendrait d'un blocage de la synthèse des hormones thyroïdiennes. En effet, de par les deux atomes d'iode retrouvés dans sa structure chimique, l'amiodarone apporte une surcharge iodée induisant une diminution du captage de l'iode par la thyroïde par effet direct sur le transporteur NIS et une inhibition transitoire de l'activité de la TPO (effet Wolff-Chaikoff).

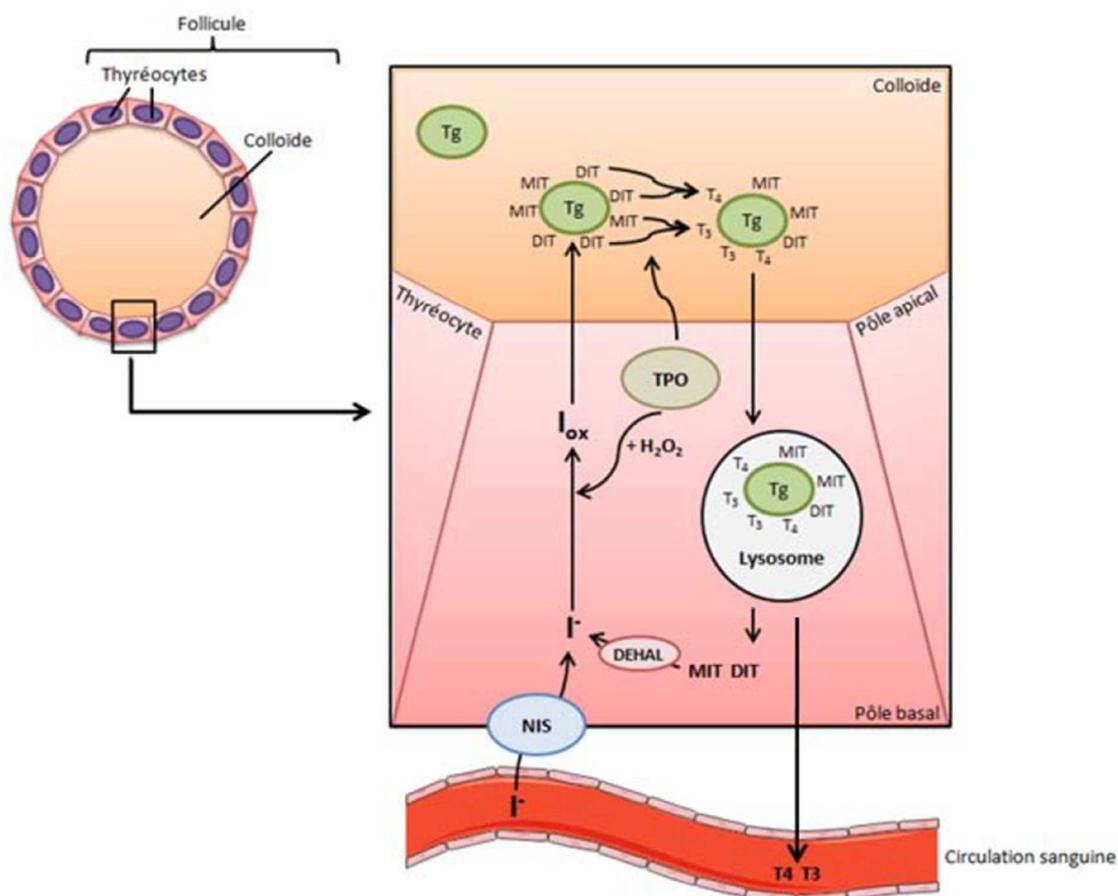


Figure 8 : production des hormones thyroïdiennes par les follicules thyroïdiens. NIS : sodium-iodure symporteur ; I : iode ; TPO : thyroperoxydase ; Tg : thyroglobuline ; DEHAL : iodotyrosine déhalogénase ; MIT : monoiodotyrosine ; DIT : diiodotyrosine ; T₄ : thyroxine ; T₃ : triiodothyronine ⁵⁶

3. Interaction avec les protéines sériques de liaison des hormones thyroïdiennes

Le transport des hormones thyroïdiennes (essentiellement la T₄) dans le compartiment sanguin est principalement assuré par trois protéines plasmatiques : la thyroxine binding globuline (TBG), la transthyrétine (TTR) et l'albumine. Néanmoins, des différences interspécifiques existent sur les plans qualitatif et quantitatif. Ainsi, la TBG est la principale protéine chez l'Homme alors que chez les rongeurs, c'est la TTR qui est majoritaire. La majorité des études toxicologiques étant réalisées sur des modèles rongeurs, les interactions de contaminants environnementaux avec les protéines sériques ont

essentiellement été décrites pour la TTR ; très peu de données de liaison à la TBG sont disponibles même si des tests *in vitro* de compétition pour la TBG humaine existent ⁵⁷. Les xénobiotiques affins pour ces protéines sériques sont susceptibles d'entrer en compétition avec la T4, de la déplacer de ses sites de liaison et d'entraîner alors une modification du ratio des concentrations de T4 libre / liée. Les polychlorobiphényles (PCB), plus particulièrement leurs dérivés hydroxylés et halogénés ⁵⁸, ainsi que le tétrabromobisphénol A (10 nM) ⁵⁹ présentent ainsi respectivement une forte affinité pour la TTR *in vitro* à des concentrations de quelques centaines de 3,6 μM et 10 nM. Celle-ci peut s'expliquer en partie par la forte analogie structurale que partagent ces composés avec la thyroxine (Figure 9). Cependant, cette hypothèse ne permet pas d'expliquer la liaison de composés structurellement aussi différents de la T4 que les phtalates ⁵⁸ et les composés perfluorés tels que le perfluorohexane sulfonate à des concentrations de l'ordre du μM ⁶⁰. Il semblerait donc que d'autres mécanismes puissent entrer en jeu dans la liaison de xénobiotiques à la TTR.

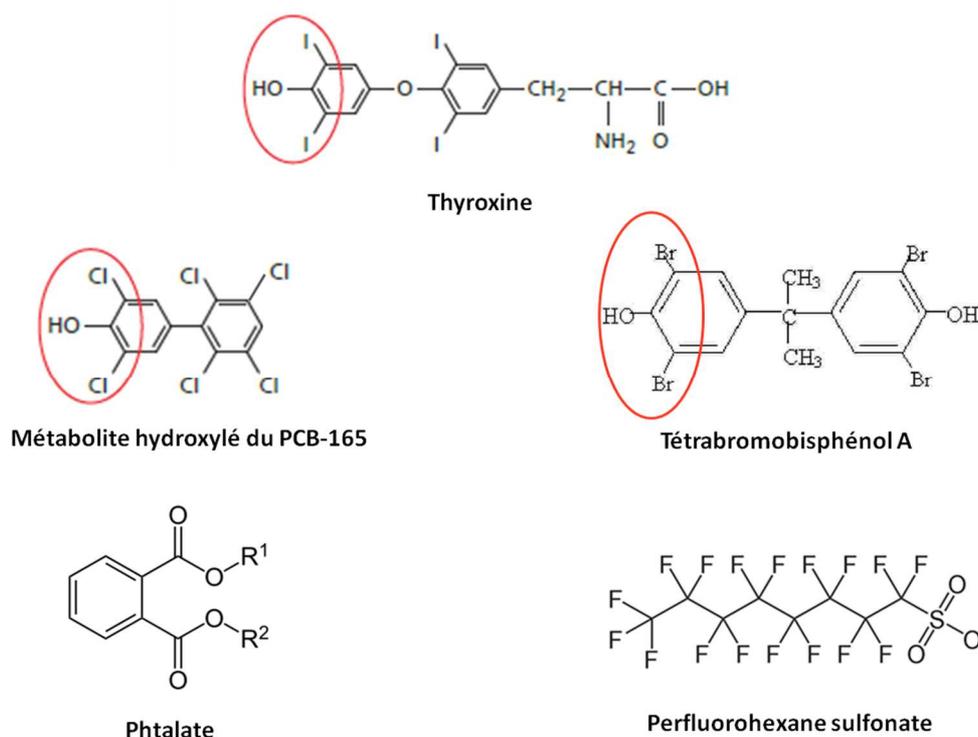


Figure 9 : structure chimique de la thyroxine et de xénobiotiques se liant à la transthyréthine. Les métabolites hydroxylés du PCB-165 et le tétrabromobisphénol A partagent une analogie structurale avec la thyroxine. En revanche, les phtalates et le perfluorohexane sulfonate (composé perfluoré) ont des structures chimiques très différentes.

4. Perturbation des voies de désiodation

Alors que la T3 est 15 fois plus affine que la T4 pour les récepteurs aux hormones thyroïdiennes ⁵⁶, environ 90% des hormones thyroïdiennes sont synthétisées par la glande thyroïdienne sont sous la forme de T4. Plus de 80% de la T3 retrouvée chez l'Homme provient alors de la conversion de T4 en T3

par le foie ⁶¹. La production de T3 est principalement régulée par deux enzymes clés : les désiodases 1 et 2. Ces enzymes assurent la conversion de T4 en T3 par suppression de l'atome d'iode présent sur le cycle externe (Figure 10). La production de T3 peut être limitée par l'activation d'une voie annexe responsable de la conversion de T4 en T3-reverse (rT3) biologiquement inactive. Cette biotransformation est catalysée par la désiodase 3 qui supprime un atome d'iode sur le cycle interne. La T3 et la rT3 sont ensuite métabolisées en T2 (diiodothyronine) métaboliquement inactive. Les désiodases sont retrouvées dans les organes d'élimination (foie, rein) et de la régulation centrale de l'axe thyroïdien (hypophyse, thyroïde) mais également dans les tissus cibles (SNC, muscles squelettiques, tissus adipeux...) pour réguler les concentrations en T3 ⁶². La localisation des différents types de désiodases présente une forte spécificité tissulaire. Ainsi, la désiodase de type 3 est très présente dans le placenta où elle contrôle l'apport materno-fœtal en hormones thyroïdiennes en désactivant la T4 en rT3.

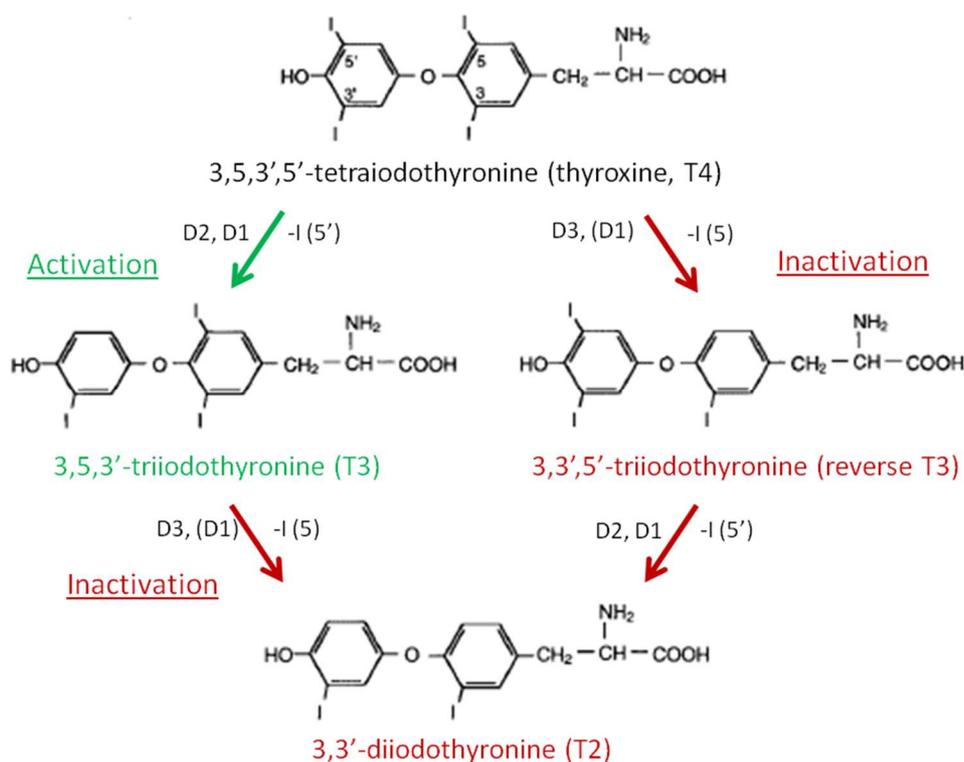


Figure 10 : structures et relations entre les principales hormones thyroïdiennes activées ou inactivées par les différentes désiodases ⁶³

Certains xénobiotiques ont la capacité d'inactiver les désiodases et entraînent alors une modification des concentrations d'hormones thyroïdiennes dans la circulation sanguine et au niveau des organes cibles. Il est à noter que ces effets peuvent être spécifiques d'une désiodase et d'un tissu. Les propriétés perturbatrices thyroïdiennes du bisphénol A reposeraient en partie sur la modulation de

l'activité des désiodases. L'OMC (octyl-méthoxycinnamate) et la benzophénone 2, deux composés utilisés pour leurs propriétés de filtres UV, réduisent, respectivement chez le rat et *in vitro*, l'activité de la désiodase hépatique de type 1 et perturbent par conséquent la synthèse extrathyroïdale de T3^{55,64}. Toutefois, cette diminution a été observée à des doses élevées, respectivement à partir de 333 et 1000 µg/kg d'OMC et de benzophénone 2. A l'inverse, l'exposition développementale de rates gestantes à l'hexachlorobiphényle (1,8 mg/kg), un composé de la famille des PCB, augmente l'activité de la désiodase 2 dans l'homogénat de cerveau des rates et de leurs progénitures⁶⁵. Le méthoxychlore (5 mg/kg), un insecticide, et le TCDD (tétrachlorodibenzo-p-dioxine ; 5 µg/kg) modifient eux aussi l'activité des désiodases hépatiques *in vivo*^{66,67}.

5. Perturbation du métabolisme hépatique des hormones thyroïdiennes

Outre les voies de désiodation, les hormones thyroïdiennes peuvent être métabolisées par les enzymes de phase II du métabolisme hépatique. La T4 peut notamment être prise en charge par des UDPGT (uridine diphosphate glucuronosyltransférase) ou des SULT (sulfotransférase) facilitant ainsi son élimination par voie biliaire. Par conséquent, l'induction des enzymes de glucuronidation et de sulfatation de la T4 augmente la clairance hépatique de cette hormone et diminue les concentrations circulantes de T4. Le pentachlorophénol, le triclosan⁶⁸, les PCB hydroxylés⁶⁹ et les métabolites des hydrocarbures aromatiques polyhalogénés⁴⁸ modulent l'activité des SULT et sont susceptibles de modifier la clairance des hormones thyroïdiennes. L'altération de la clairance des hormones thyroïdiennes *via* une induction des UDPGT a quant à elle été décrite chez des rates exposées à des dioxines (TCDD 200 ng.kg⁻¹.j⁻¹; VO) ainsi que leurs nouveau-nés⁷⁰.

6. Perturbation du transfert intracellulaire des hormones thyroïdiennes

Avant d'atteindre les récepteurs nucléaires, les hormones thyroïdiennes doivent franchir les membranes des cellules cibles. Ce transfert est assuré par des transporteurs protéiques des familles suivantes : les Organic Anion-Transporting Polypeptides (OATP dont l'isoforme OATP1C1 qui transporte spécifiquement les hormones thyroïdiennes), les Multidrug Resistance-associated Proteins (MRP), les Monocarboxylate Transporters (MCT et plus particulièrement l'isoforme MCT8), les L-type Amino acid Transporters (LAT) et la Na/Taurocholate Cotransporting Polypeptide (NTCP)⁷¹. Chez l'Homme, la mutation du gène codant pour le transporteur MCT8 est d'ailleurs caractérisée par des sévères troubles du développement et du métabolisme ainsi que des modifications des concentrations sanguines en hormones thyroïdiennes (syndrome Allan-Herndon-Dudley)⁷². Chez les souris déficientes

pour les gènes codant pour les protéines MCT8 et/ou OATP1, les concentrations en hormones thyroïdiennes dans le cerveau sont altérées ^{73,74}.

Les systèmes de transport intracellulaire des hormones thyroïdiennes peuvent être la cible de perturbateurs thyroïdiens. Ainsi, l'exposition de souris à une forte dose BDE 47 (100 mg.kg⁻¹.j⁻¹), un composé de la famille des PBDE, entraîne une diminution des concentrations sériques de TT4 qui pourrait être due à une diminution de l'expression des ARNm MCT8 ⁷⁵. Par ailleurs, différents phtalates (di-n-butylphtalate ; n-butylbenzylphtalate) peuvent bloquer *in vitro* la capture intracellulaire de T3 avec une concentration inhibitrice 50% de l'ordre du µM ⁷⁶.

7. Modulation de la liaison aux récepteurs des hormones thyroïdiennes

Au sein des cellules cibles, les hormones thyroïdiennes (en particulier la T3) se lient à leurs récepteurs nucléaires (Figure 11). Le récepteur forme alors un hétérodimère avec d'autres récepteurs nucléaires tels que RXR (Retinoid X Receptor). Le complexe se fixe ensuite aux domaines TRE (Thyroid hormone Response Element) de l'ADN qui constituent les régions promotrices des gènes induits par les hormones thyroïdiennes. Des facteurs co-activateurs peuvent se lier au complexe et augmenter le taux de transcription de ces gènes. Les co-activateurs les plus connus sont ceux de la famille p160 (SRC-1, GRIP-1 ; pCIP) qui possèdent une activité histone acétyltransférase. A l'inverse, il existe des facteurs co-répresseurs tels que N-CoR (nuclear receptor corepressor) et SMRT (Silencing mediator for retinoid and thyroid receptors). En l'absence de ligand, les facteurs co-répresseurs se fixent au TRE et diminuent activement la transcription basale des gènes cibles des hormones thyroïdiennes ⁵⁶.

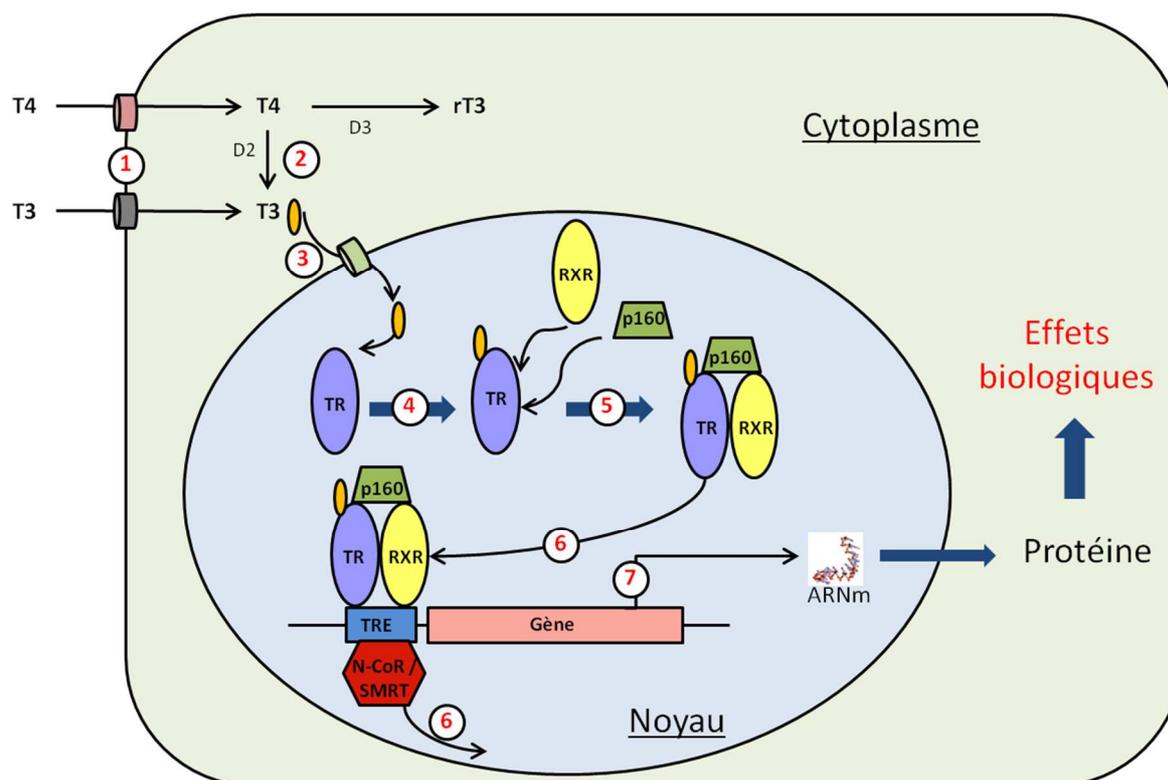


Figure 11 : schéma de la cascade de transduction activée par les hormones thyroïdiennes.

- (1) Transport intracellulaire de la T4 ou la T3 via les différents transporteurs spécifiques des hormones thyroïdiennes
- (2) Activation en T3 ou inactivation en rT3 de la T4 par les désiodases spécifiques
- (3) Transfert intranucléaire de la T3 via les transporteurs spécifiques
- (4) Liaison de la T3 au récepteur des hormones thyroïdiennes (TR)
- (5) Hétérodimérisation par liaison du récepteur aux hormones thyroïdiennes avec récepteur aux rétinoïdes (RXR) et fixation d'un co-activateur de la famille p-160
- (6) Fixation du complexe au domaine TRE (thyroid hormone responsive element) de l'ADN et décrochage du co-répresseur (N-CoR /SMRT)
- (7) Transcription du gène cible des hormones thyroïdiennes et traduction de l'ARNm aboutissant à un effet biologique.

Les différentes étapes de la cascade de transduction peuvent être modulées par des perturbateurs thyroïdiens. De nombreuses études montrent que les métabolites hydroxylés des PCB bloquent la cascade de transduction induite par la T3⁵⁸. Il a ainsi été montré sur des cultures de cellules d'hypophyse de rat qu'ils inhibent la liaison de la T3 aux récepteurs thyroïdiens à des doses de 1-100 μM ⁷⁷. Ils empêcheraient le recrutement du co-activateur p160/SRC-1 et supprimeraient ainsi la formation du complexe TR/SRC nécessaire à la transcription des gènes régulés par les hormones thyroïdiennes⁶³. Ces composés entraîneraient également la dissociation de l'hétérodimère TR/RXR au niveau des TRE⁷⁸.

Les PBDE interagissent également avec les récepteurs nucléaires des hormones thyroïdiennes⁴⁸. Ainsi, sur des cellules CHO (chinese hamster ovary) transfectées, le métabolite hydroxylé 4-OH-BDE-90 (10 µM) a un effet antagoniste sur l'expression de la luciférase contrôlée par les promoteurs des gènes TRα1 et TRβ1⁷⁹. Le mécanisme impliqué dans la perturbation thyroïdienne des PBDE pourrait passer par la diminution des concentrations circulantes de vitamine A, l'acide rétinoïque co-régulant l'expression des gènes induits par les hormones thyroïdiennes¹⁴.

Le blocage de l'expression des gènes induits par la T3 a aussi été décrit pour le TBBPA et certains phtalates tels que le DEHP (di-2-éthylhexyl-phtalate)^{58,77,80}.

B. Effets biologiques des perturbateurs thyroïdiens

Comme le soulignent les symptômes observables chez les patients souffrant d'hypothyroïdie, les hormones thyroïdiennes régulent de nombreuses fonctions biologiques. Elles contrôlent ainsi l'activité cardiaque et modulent les métabolismes :

- protéique en augmentant la biosynthèse des protéines
- glucidique en favorisant la dégradation du glycogène
- lipidique en accélérant la lipolyse.

Par ailleurs, les hormones thyroïdiennes contrôlent également le développement du système nerveux central (SNC) fœtal. La forte dépendance du SNC vis-à-vis des hormones thyroïdiennes maternelles et/ou fœtales est d'ailleurs dramatiquement illustrée par le syndrome de crétinisme. Ce syndrome est observé chez des enfants issus de mères présentant une forte carence en iode et il se caractérise par des altérations motrices et mentales sévères. En effet, les hormones thyroïdiennes régulent des étapes essentielles de la neurogenèse.

Les mécanismes de **prolifération cellulaire** sont sous la dépendance des hormones thyroïdiennes qui agissent majoritairement via les récepteurs TRα1⁸¹. Une hypothyroïdie périnatale se traduit chez le raton et le souriceau par une réduction du nombre⁸² et un ralentissement de la prolifération⁸³ des cellules progénitrices de la couche granulaire externe du cervelet et de l'hippocampe⁸⁴.

La **migration cellulaire** est également sous le contrôle des hormones thyroïdiennes comme en témoigne les altérations de migration neuronale observées dans le cortex somatosensitif et l'hippocampe de ratons issus de mères présentant une hypothyroxinémie sévère⁸⁵.

D'autre part, les hormones thyroïdiennes ont un rôle essentiel dans la **synaptogenèse**. Ceci est particulièrement visible sur les cellules de Purkinje du cervelet (Figure 12). Ces neurones émettent, à partir de leurs corps cellulaires regroupés dans la couche de Purkinje, un très grand nombre de dendrites formant une véritable arborisation dendritique dans la couche moléculaire du cervelet ⁸⁶. Sur un modèle de rat *rdw* hypothyroïdien, les nouveau-nés présentent, à 15 jours post-natal, des anomalies de la morphogenèse du cortex cérébelleux se traduisant notamment par une arborisation dendritique retardée et à un amincissement de la couche moléculaire ⁸⁷.

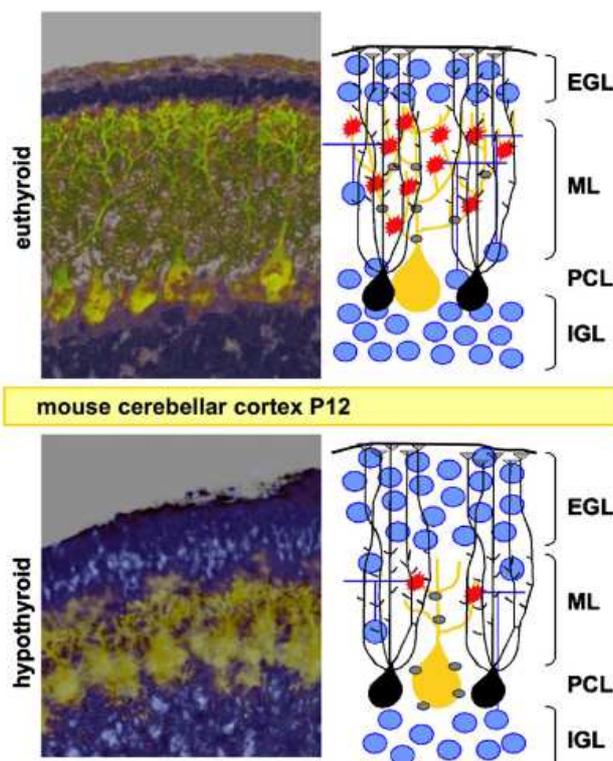


Figure 12 : effets d'une hypothyroïdie congénitale sur le développement du cortex cérébelleux chez une souris à 12 jours post-natal. EGL = external granule cell layer ; ML = molecular layer ; PCL = Purkinje cell layer ; IGL = internal cell layer ⁸⁶

Les hormones thyroïdiennes agissent également sur la **différenciation cellulaire**, et notamment sur la différenciation des précurseurs de cellules gliales en oligodendrocytes ou en astrocytes. Ainsi, la différenciation de la glie de Bergmann, constituée de cellules astrocytaires de la couche granulaire interne du cervelet, est retardée chez des souris mutées pour le récepteur aux hormones thyroïdiennes ⁸⁸. Par ailleurs, chez des rates gestantes, le traitement au propylthiouracil, un inhibiteur de la TPO, induit chez les ratons une diminution dose-dépendante des concentrations sériques de T4 totale ⁸⁹. Cette hypothyroïdie est associée à une diminution de l'expression du facteur MAG (Myelin-Associated Protein, marqueur des oligodendrocytes) et une augmentation de l'expression GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein, marqueur des astrocytes) dans le corps calleux et la commissure antérieure (Figure 13).

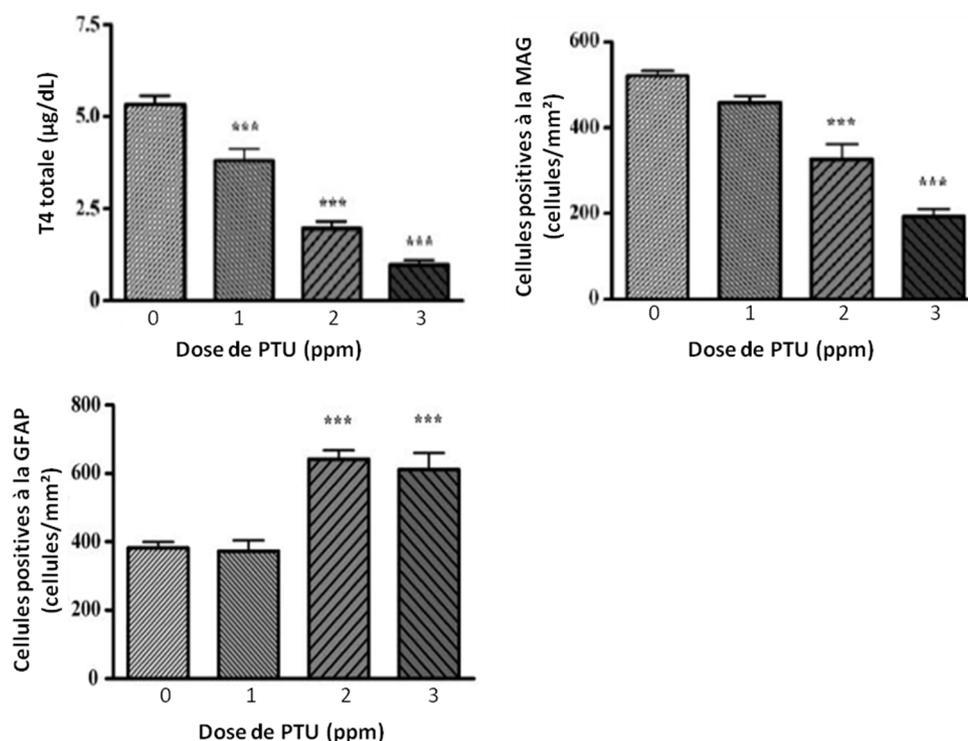


Figure 13 : diminution de la concentration sérique de T4 et altération de la différenciation des précurseurs des cellules gliales en oligodendrocytes exprimant le facteur MAPG (myelin-associated glycoprotein) ou en astrocytes exprimant le facteur GFAP (glial fibrillary acidic protein) dans le corps calleux de rats issus de mères traitées avec du propylthiouracil (PTU), un agent antithyroïdien ⁸⁹.

Les effets d'une hypothyroïdie sur la différenciation des cellules gliales ont inévitablement un rôle sur la **myélination neuronale** puisque ce sont les oligodendrocytes qui produisent la myéline ⁹⁰. Il n'est alors pas surprenant qu'une hypothyroïdie soit associée à une myélination retardée et réduite ⁹¹. Sur un modèle de souris présentant un récepteur aux hormones thyroïdiennes muté incapable de fixer la T3, une diminution de l'expression ARNm de la MBP (Myelin Basic Protein) a été relevée ⁹².

Dans ces conditions, l'exposition de la femme enceinte à des perturbateurs thyroïdiens est susceptible d'altérer le développement du SNC. Il convient toutefois de noter que la très grande majorité des effets d'une hypothyroïdie sur le SNC ont été décrits chez des animaux présentant des concentrations circulantes de T3/T4 diminuées de plus de 50 %, soit des contextes d'hypothyroïdie très sévères. Or, aux niveaux d'exposition décrits chez l'Homme, les perturbateurs thyroïdiens ne semblent pas à même d'instaurer des états de carences en hormones thyroïdiennes aussi profonds, mais davantage d'induire de subtiles modifications de l'homéostasie thyroïdienne. Ainsi, l'exposition humaine à des perturbateurs thyroïdiens pourrait faciliter l'instauration d'hypothyroxinémie, un statut défini par une

diminution de la concentration sanguine de T4 sans modification de TSH et observé 150-200 fois plus fréquemment qu'une hypothyroïdie chez les femmes enceintes⁹³.

Or, longtemps considérées comme bénignes, ces modulations subcliniques de l'homéostasie thyroïdienne chez la femme enceinte semblent aujourd'hui être associées à des altérations des circuits neuronaux et à de légers troubles de la fonction cognitive chez l'enfant (Figure 14).

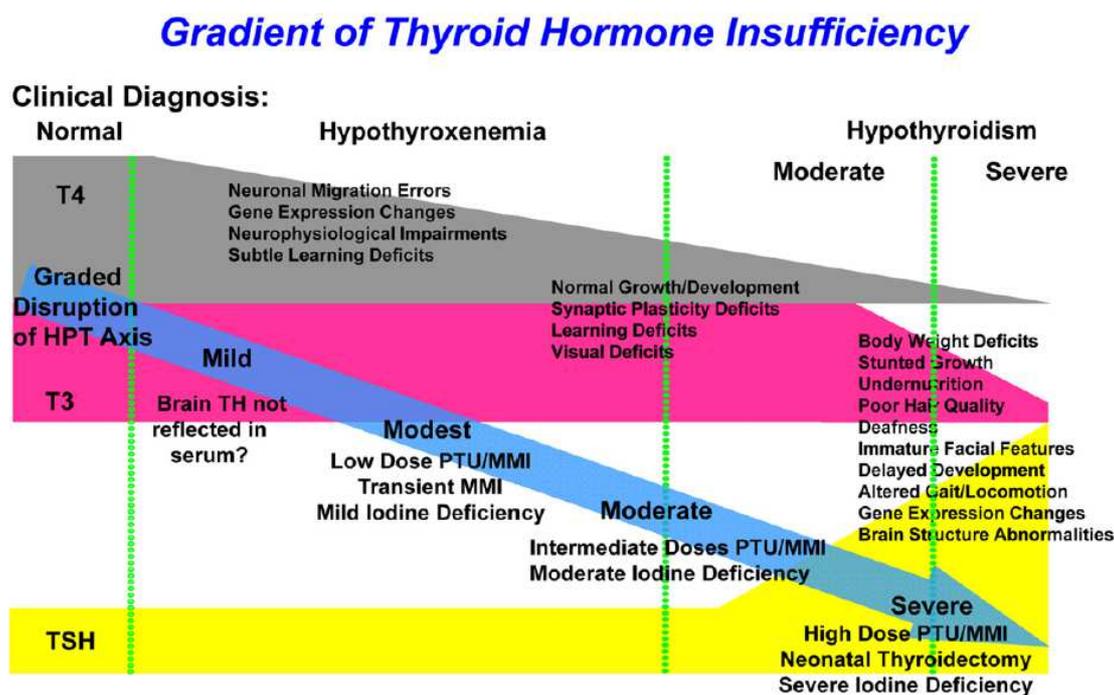


Figure 14 : schéma récapitulatif des effets de différents degrés d'insuffisance en hormones thyroïdiennes sur le développement du SNC observés chez l'Homme et l'animal⁴⁷

Pour exemple, bien qu'il soit difficile d'éliminer tous les facteurs confondants (niveau d'éducation familiale, exposition à d'autres composés...), de nombreuses études épidémiologiques suggèrent que l'exposition périnatale à des PCB, des perturbateurs thyroïdiens avérés, diminue les capacités cognitives des enfants⁹⁴. Ainsi, sur une cohorte d'enfants de 9 ans nés entre 1991 et 1994 à Oswego (New-York, USA), l'exposition prénatale au PCB était négativement corrélée au quotient intellectuel des enfants⁹⁵. Pour chaque augmentation de la concentration placentaire en PCB de 1 ng/g, le quotient intellectuel global était diminué en moyenne de 3 points ($p=0.02$). Une perte de 4 points ($p=0.003$) a même été retrouvée pour le quotient intellectuel relatif à la communication verbale.

De même, l'exposition périnatale à différents PBDE serait associée à des troubles cognitifs. Chez des enfants de 12 (n=118), 24 (n=117), 36 (n=114), 48 (n=104) et 72 (n=96) mois nés à New-York (USA), les enfants plus fortement exposés durant la gestation au BDE-47, 99 ou 100 (exposition estimée à partir des concentrations dans le sang de cordon) présentaient des plus faibles scores de développement physique et mental ⁹⁶. Or, l'exposition périnatale en BDE-100 et 153 serait associée à une augmentation du risque d'hypothyroxinémie ⁹⁷.

IV. Les modèles d'étude des perturbateurs thyroïdiens

A. Modèles *in vitro*

Les modèles *in vitro* sont de plus en plus encouragés en toxicologie. Le T-screen est l'un des modèles les plus utilisés pour tester les propriétés perturbatrices thyroïdiennes d'un composé. Il repose sur l'induction de la prolifération de cellules GH3 (lignée de cellules tumorales hypophysaires de rat) lors de l'activation des récepteurs aux hormones thyroïdiennes⁹⁸. Les cellules GH3 ont l'avantage de présenter les 2 isoformes (α et β) des récepteurs aux hormones thyroïdiennes. Pour le test, les cellules GH3 sont exposées pendant 96 heures avec de la T3 et/ou la molécule test puis le nombre de cellules est évalué à l'aide d'un test de prolifération colorimétrique. Il est alors possible d'évaluer les propriétés agonistes ou antagonistes de la substance test.

Depuis quelques années, le système a été amélioré pour diminuer la durée du test (de 96 à 24 heures) et améliorer la spécificité du test. En effet, des cas de prolifération cellulaire indépendants d'un mécanisme de perturbation thyroïdienne ont été décrits. Dans le test amélioré, les cellules GH3 ont été transfectées avec un plasmide contenant le gène reporter de la luciférase placé sous le contrôle d'un promoteur des gènes cibles des hormones thyroïdiennes⁹⁹. Le test ne repose alors plus sur la mesure de la prolifération cellulaire mais sur l'évaluation de l'activité des gènes cibles des hormones thyroïdiennes via la quantification du signal à la luciférase. La sensibilité du test est très élevée puisque l'activité luciférase est induite dès des concentrations de T3 de quelques pM (Figure 15). L'effet de la T3 est maximal pour une concentration de 10 nM. La Figure 16 montre l'activité luciférase de métabolites hydroxylés d'un tétrabromodiphényléther (4-OH-BDE-69) et d'un pentabromodiphényléther, (4-OH-BDE-121) relativement à l'activité luciférase observée à 10 nM de T3. On remarque qu'à 10 μ M, les composés induisent un signal correspondant à environ 20% (4-OH-BDE-69) et 5% (4-OH-BDE-121) du signal observé avec la T3 à 10 nM.

De nombreuses constructions plasmidiques semblables ont été réalisées pour tester les propriétés perturbatrices thyroïdiennes de composés. Pour exemple, sur un modèle de cellules TSA 201 transfectées avec un plasmide contenant la séquence codant pour les récepteurs humains aux hormones thyroïdiennes TR α 1 et TR β 1, Moriyama et al. ont mis en évidence que le BPA inhibe l'effet de la T3¹⁰⁰.

Il est également possible d'évaluer *in vitro* l'effet de composés sur l'activité de la TPO ou encore sur l'expression de gènes régulés par les hormones thyroïdiennes (*Slc5a5*, *Tpo*, *Tg*, *Pax8*, *Foxe1*...) en réalisant une RT-qPCR à partir d'ARN isolé de cellules exposées à différents composés¹⁰¹.

Dans la partie 4 du manuscrit, un exemple original d'utilisation de culture primaire d'hépatocytes visant à étudier les effets du fipronil sur le métabolisme hépatique des hormones thyroïdiennes est présenté.

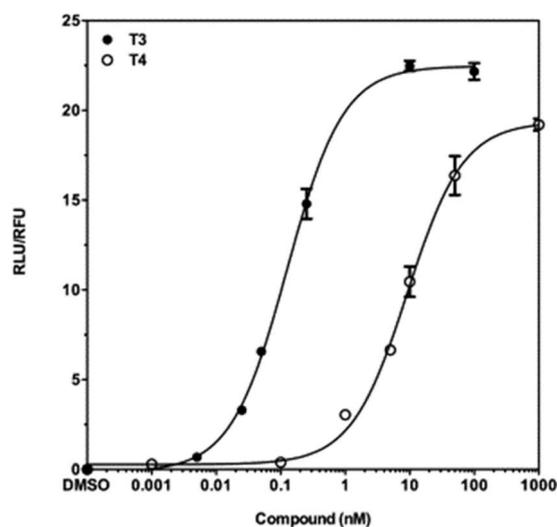


Figure 15 : induction de l'activité luciférase en réponse à une exposition des cellules GH3-TRE-Luc pendant 24 heures à la T3 et la T4. Les résultats (moyennes \pm SD de triplicats) sont exprimés sous forme de l'intensité du signal lumineux relié à l'activité luciférase (RLU) normalisée par la fluorescence totale (RFU ; caractérisant le nombre de cellules viables) ⁹⁹

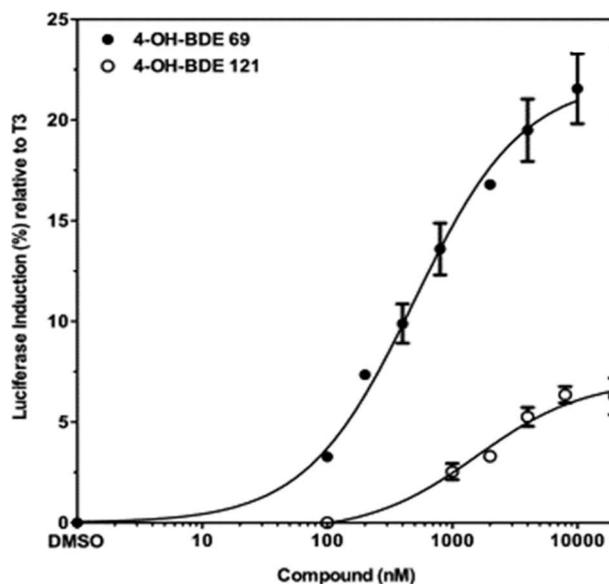


Figure 16 : : induction de l'activité luciférase en réponse à une exposition pendant 24 heures des cellules GH3-TRE-Luc au 4-OH-BDE-69 et au 4-OH-BDE-121. Les résultats expriment l'activité luciférase obtenue avec les deux composés normalisée par l'activité luciférase obtenue avec la T3 10 nM ⁹⁹.

Les modèles *in vitro* présentent l'avantage d'être rapides et peu coûteux. Ils permettent de réaliser un criblage à haut débit de nombreux composés. Pour exemple, le test GH3-TRE-Luc a récemment été miniaturisé sur une plaque 1536 puits pour être capable de tester autant de composés en 24 heures ¹⁰². Face à la nécessité de tester la multitude de composés chimiques retrouvés dans l'environnement, ce type de criblage à haut débit est particulièrement encouragé par les agences d'évaluation telles que l'EPA. Ceci est d'autant plus vrai que les modèles *in vitro* s'intègrent parfaitement dans l'esprit de la politique des 3R en répondant à la notion de « remplacement ».

Ces modèles sont donc utilisés à des fins de criblage mais également à des fins mécanistiques. En effet, en isolant un mécanisme cellulaire précis de la régulation thyroïdienne, ce type de modèle permet souvent d'éclaircir le mode d'action sous-jacent à une perturbation thyroïdienne mise en évidence sur les modèles animaux. De plus, le recours à des modèles cellulaires est souvent le seul moyen de tester un composé sur du tissu humain.

En contrepartie, la réduction d'un organisme entier à une cellule unique présente un inconvénient majeur. Elle n'intègre pas la complexité de la régulation des fonctions endocriniennes et l'existence possible de mécanismes de compensation. Pour exemple, on peut imaginer que l'altération de l'activité de la TPO puisse être contrebalancée *in vivo* par une modulation de l'activité des désiodases catalysant la conversion de la T4 en T3 ou rT3. Ainsi, la mise en évidence *in vitro* de la modification d'un mécanisme cellulaire précis constitue une alerte pour l'évaluateur mais ne prévaut pas des conséquences effectives dans un système aussi intégré que l'Homme.

Par ailleurs, à l'image du modèle cellulaire GH3, les modèles *in vitro* reposent souvent sur des lignées cellulaires. Il est important de garder en mémoire que ces lignées proviennent de cellules cancéreuses transformées. Elles présentent donc potentiellement une modulation de certaines cascades de signalisation pouvant modifier la réponse observée. De plus, ces modèles cellulaires ne possèdent pas nécessairement tout l'équipement enzymatique nécessaire à la métabolisation de la molécule testée. Or, il est fréquent que le métabolite soit biologiquement plus actif que la molécule mère ¹⁰³. Il est toutefois possible de contrecarrer ce biais en ajoutant dans le milieu une fraction microsomale S9.

B. Modèles amphibiens et zebrafish

Les larves de xénopes et de zebrafish sont très utilisées pour l'étude de la fonction thyroïdienne. En effet, chez ces organismes, les étapes de métamorphose sont sous la dépendance quasi-exclusive des hormones thyroïdiennes ¹⁰⁴. Ainsi, l'observation directe de larves exposées / non-exposées permet de mettre directement en lumière une modification de l'homéostasie thyroïdienne. Pour exemple,

l'exposition au butachlore de larves de *Xenopus laevis* conduit, à 14 et 21 jours post-fécondation, à une croissance accélérée des membres inférieurs associée à une augmentation de la concentration tissulaire en T3 et T4 ¹⁰⁵. A l'inverse, l'exposition de larves à des retardateurs de flamme bromés (hexabromododécane et nonabromodiphényléther) ¹⁰⁶ ou au bisphénol A (Figure 17) ¹⁰⁷ induit un retard de la régression de la queue soulignant un effet antagoniste à la T3.

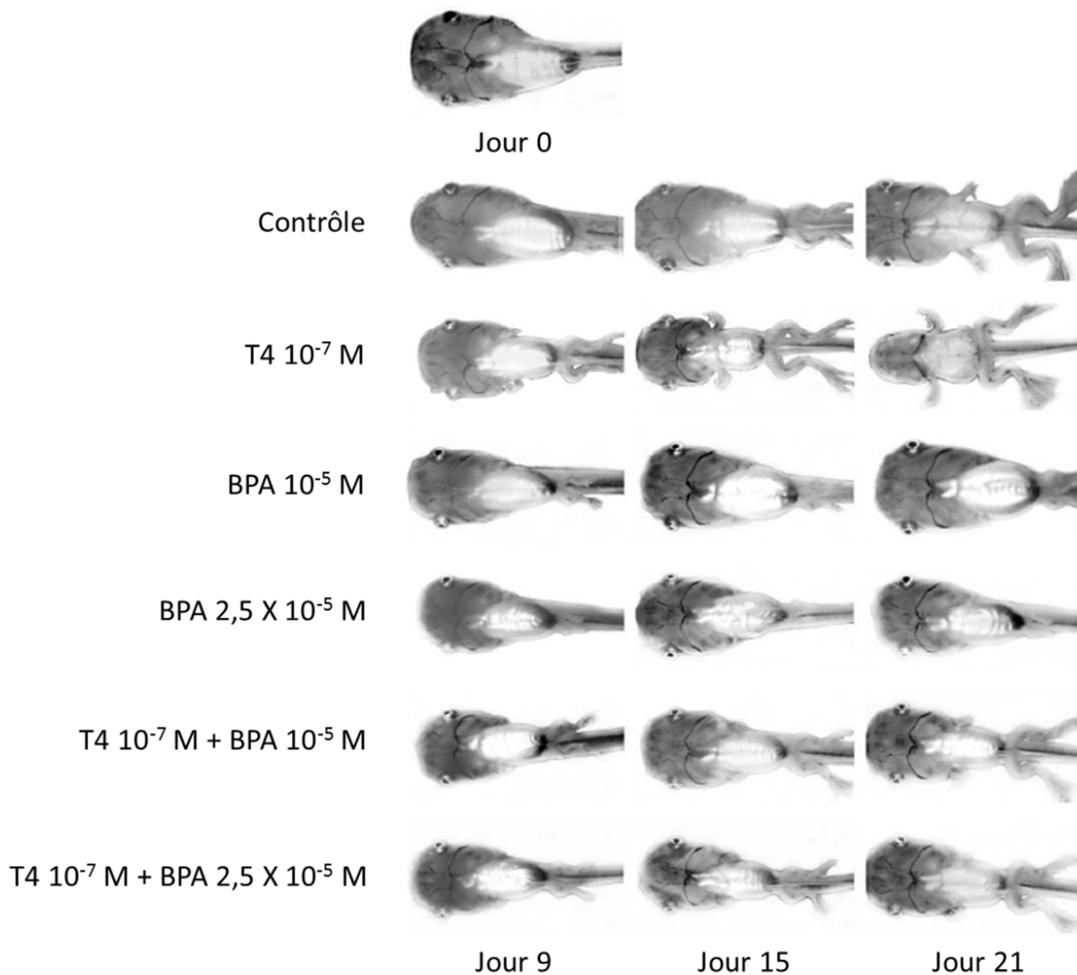


Figure 17 : photos de larves de *Xenopus laevis* exposées pendant 9 – 15 ou 21 jours au contrôle, à la T4 (10^{-7} M) et/ou au BPA (10^{-5} M et $2,5 \times 10^{-5}$ M). On note que le BPA ralentit le développement induit par la T4 ¹⁰⁷.

Par ailleurs, des larves de xénopes ou de zebrafish génétiquement modifiées pour exprimer la GFP (Green Fluorescent Protein) lors de l'activation du promoteur des gènes cibles de la T3 sont également utilisées ^{80,108}. L'observation microscopique permet de comparer la fluorescence émise par des organismes exposés / non-exposés et de visualiser directement les zones dans lesquelles l'expression des gènes contrôlés par la T3 est modifiée (Figure 18).

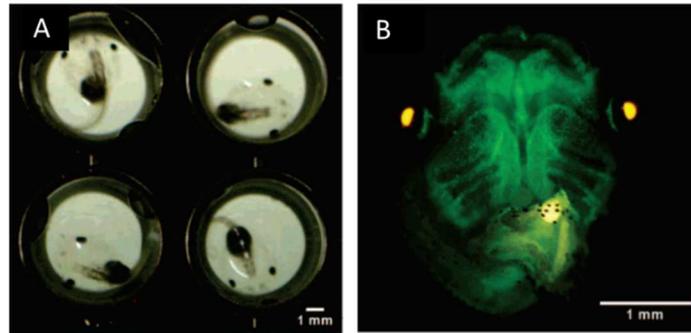


Figure 18 : (A) culture de larves *Xenopus laevis* en plaque 96 puits. (B) observation microscopique de la fluorescence émise dans le système nerveux central et les branchies de larves génétiquement modifiées pour exprimer la GFP (Green Fluorescent Protein) lors de l'activation du promoteur des gènes cibles de la T3⁸⁰

A l'image de ce qui peut être réalisé *in vitro* mais à un niveau d'intégration supérieur (axe thyroïdien intégral), les modèles de larves de xénopes et de zébrafish sont très utilisés pour le criblage de molécules. Bien qu'ils n'échappent pas à la directive 2010/63/UE relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (formes larvaires autonomes de vertébrés), ces modèles constituent, au regard de la politique des 3R, une amélioration par rapport aux modèles mammifères et sont par conséquent appréciés sur le plan de l'éthique animale.

Compte-tenu de sa très grande importance dans la régulation du métabolisme basal, la physiologie thyroïdienne a été bien conservée au fil de l'évolution des espèces. Ainsi, les amphibiens et les poissons présentent un axe thyroïdien relativement proche de celui retrouvé chez l'Homme. On peut toutefois noter que, chez ces organismes, la libération de TSH n'est pas contrôlée par la TRH mais par le CRF (corticotropin-releasing factor)¹⁰⁹.

Par ailleurs, contrairement aux mammifères, ces organismes présentent un développement extra-utérin. Il est alors possible d'observer directement dans le milieu extérieur l'effet de composés sur les premiers stades de développement. Néanmoins, ceci constitue par la même occasion un inconvénient. En effet, les formes larvaires sont autonomes dans l'environnement. Il n'existe alors pas de transfert materno-fœtal d'hormones thyroïdiennes chez ces organismes alors que chez l'espèce humaine, le système thyroïdien fœtal ne devenant fonctionnel qu'aux environs de 70 jours de grossesse, le fœtus est sous la stricte dépendance des hormones thyroïdiennes maternelles au cours du 1^{er} trimestre de grossesse.

D'autre part, si ces modèles sont bien adaptés à la détection de composés perturbateurs thyroïdiens, ils ne permettent pas d'explorer les effets de ces composés sur le développement du SNC fœtal. En effet, il existe de nombreuses divergences d'anatomie et d'ontogenèse du SNC entre l'Homme et les amphibiens ou les poissons.

C. Les modèles mammifères

Les modèles mammifères constituent sans conteste les modèles les plus pertinents par rapport à l'Homme au regard de la proximité phylogénique de ces espèces. Néanmoins, au sein même de la classe des mammifères, des différences inter-spécifiques de régulation thyroïdienne existent et doivent être prises en considération lors du choix du modèle et de l'analyse critique des résultats obtenus. Ainsi, si les rongeurs sont classiquement utilisés en toxicologie, ils ne constituent pas le modèle le plus pertinent par rapport à l'Homme pour l'étude des perturbateurs thyroïdiens. En revanche, l'espèce ovine est reconnue depuis de nombreuses années comme un modèle de choix pour l'étude de la fonction thyroïdienne chez l'Homme.

1. Chez l'adulte

Le tableau 1 présente les concentrations plasmatiques moyennes de T3 et T4 totale ainsi que les fractions libres de T3 et T4 décrites chez l'Homme, le mouton, le rat et la souris. On note que, en comparaison de l'Homme, la T3 totale est retrouvée à des concentrations similaires chez le mouton mais à des niveaux presque 2 fois plus faibles chez le rat et la souris. De même, chez la souris, la concentration de T4 totale est près de 3 fois plus faible que chez l'Homme. Par ailleurs, les fractions libres de T3 et de T4, c'est-à-dire les fractions bioactives, sont globalement plus élevées chez les rongeurs.

Cette différence s'explique principalement par les différences de transporteurs plasmatiques des hormones thyroïdiennes retrouvées chez ces espèces. En effet, chez l'Homme, les hormones thyroïdiennes sont majoritairement transportées dans le sang par la TBG (thyroxine binding globuline). Cette protéine assure le transport de 74% de la T4 liée, le reste étant transportée par la transthyréline (TTR ; 19%) et l'albumine (8%). Chez le mouton, la TBG reste la protéine plasmatique transportant la majorité de la T4 (53%). En revanche, chez le rat adulte, la TBG est absente¹¹⁰ et 85% de la T4 est transportée par la TTR. Or, la TBG présente une affinité beaucoup plus importante pour la T4 que la TTR comme en témoigne les constantes de dissociation pour la T4 globalement 50-60 fois plus faibles pour la TBG que pour la TTR¹¹¹. La liaison d'une hormone étant généralement associée à une plus faible clairance métabolique, cette différence inter-espèce sur les transporteurs plasmatiques des hormones thyroïdiennes expliquent, au moins en partie, le temps de demi-vie de la T4 beaucoup plus faible chez le rat et la souris par rapport à l'Homme et le mouton. Par conséquent, un rat dépourvu de thyroïde fonctionnelle nécessite, relativement au poids corporel, un apport de T4 dix fois plus important qu'un Homme adulte pour restaurer les concentrations physiologiques¹¹²

Certains auteurs s'accordent à dire que les différences inter-espèces de transporteurs plasmatiques seraient à l'origine de la plus grande sensibilité du rat à une perturbation thyroïdienne et de sa plus forte propension à développer des carcinomes thyroïdiens que l'Homme ou le mouton¹¹³. Néanmoins, cette hypothèse n'a pas encore été vérifiée et reste à démontrer.

Tableau 1 : comparaison des concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes totales, des fractions libres et des temps de demi-vie des hormones thyroïdiennes chez l'Homme, le mouton, le rat et la souris^{71,111}

	Homme	Mouton	Rat	Souris
Concentration plasmatique de T3 totale (pg/mL)	1,2	0.8 – 1.6	0,7	0,7
Concentration plasmatique de T4 totale (ng/mL)	78	52-56	54	24
Fraction de T3 libre (%)	0.3	0.3	0,54	0,35
Fraction de T4 libre (%)	0.02	0.02	0,04	0,06
Temps de demi-vie de la T4 (jours)	5 - 9	1,5	0,5 - 1	0,5 – 0,75

2. Chez le fœtus

L'ontogénèse de l'axe thyroïdien peut être découpée en 4 phases successives :

- l'embryogénèse de la glande thyroïdienne et de l'hypophyse ;
- la maturation de l'hypothalamus ;
- le développement du contrôle neuroendocrinien ;
- la maturation du métabolisme tissulaire.

Le tableau 2 montre la chronologie de ces 4 phases chez l'Homme, le mouton et le rat. On remarque que, relativement à la durée de gestation, l'ontogénèse de la fonction thyroïdienne est semblable entre les espèces ovine et humaine. Ainsi, à la naissance, le nouveau-né ovin présente un système thyroïdien mature comparable à celui observé chez le nouveau-né humain. Ces espèces sont dites « précoces » par opposition aux espèces dites « tardives » telles que le rat¹¹⁴. En effet, les rongeurs sont caractérisés par le développement post-natal d'un grand nombre d'évènements clés. Ainsi, le développement de l'hypophyse et le contrôle rétroactif se poursuivent après la naissance. La synthèse de T4 et T3 débute au 20^{ème} jour de gestation mais les concentrations sériques continuent d'augmenter

au cours des 3 premières semaines post-partum. De plus, bien que la TRH soit présente dans l'hypothalamus, elle ne semble pas influencer l'axe hypothalamus-hypophyse-thyroïde jusqu'à la fin de la 2^{ème} semaine post-natale. La fonction thyroïdienne du nouveau-né humain ou ovin est ainsi comparable à celle d'un raton de 15-20 jours.

Par ailleurs, le développement du SNC étant sous la stricte dépendance des hormones thyroïdiennes, le retard de maturation de l'axe thyroïdien chez le rat induit également un retard de développement du SNC chez cette espèce par rapport à l'Homme ou au mouton. Ainsi, alors que le SNC humain est presque mature à la naissance, de nombreuses étapes de neurogenèse se mettent en place après la naissance pour le raton. L'influence maternelle sur les stades de neurogenèse tardifs est donc plus limitée que pour les espèces précoces. De nombreux processus du développement du SNC ne sont régulés que par la fonction thyroïdienne du nouveau-né.

En outre, cela pose un problème du point de vue de l'exposition aux perturbateurs endocriniens du fœtus à ces stades tardifs critiques puisque, chez les rongeurs, elle sera affranchie de la barrière placentaire.

L'ensemble de ces éléments soulignent donc les limites du modèle rongeur pour l'étude de perturbateurs thyroïdiens. Celles-ci conduisent très souvent à la réfutation des effets sur la fonction thyroïdienne mis en émoi chez les rongeurs, notamment dans le cadre d'évaluations toxicologiques réglementaires¹¹². Malgré les contraintes zootechniques qu'il apporte, le modèle ovin présente à l'inverse de grandes similarités avec l'Homme en termes de physiologie thyroïdienne, ce qui favorise l'extrapolation à l'Homme des résultats observés chez cette espèce.

Tableau 2 : comparaison de la chronologie des principales phases de l'ontogénèse de la fonction thyroïdienne chez les espèces humaine, ovine et rat ¹¹⁵

Espèce	Phases du développement			
	Embryogénèse	Maturation de l'hypothalamus	Développement du contrôle neuroendocrinien	Maturation du métabolisme périphérique
	a) Développement de la thyroïde jusqu'aux follicules matures b) Développement de l'hypophyse incluant la synthèse hormonale	a) Maturation histologique b) Augmentation de la concentration sanguine de TRH c) Maturation du plexus portal primaire	a) Augmentation des concentrations de TSH sériques et hypophysaires b) Maturation du rétrocontrôle négatif c) Maturation de la réponse à la TRH	a) Augmentation de la concentration sérique de T3 c) Diminution des concentrations sériques de rT3 d) Equilibration des taux de production T3 / rT3
Mouton (145 jours de gestation)	0 – 12 ^{ème} semaines de gestation	10 ^{ème} – 30 ^{ème} semaines de gestation	16 ^{ème} semaine de gestation – 1 ^{er} mois post-partum	30 ^{ème} semaine de gestation – 1 ^{er} mois post-partum
Homme (40 semaines de gestation)	0 – 60 ^{ème} jours de gestation	60 ^{ème} – 150 ^{ème} jours de gestation	70 ^{ème} jour de gestation – 1 ^{ère} semaine post-partum	120 ^{ème} jour de gestation – 1 ^{er} mois post-partum
Rat (22 jours de gestation)	0 – 20 ^{ème} jours de gestation	16 ^{ème} jour de gestation – 3 ^{ème} semaines post-partum	4 ^{ème} – 18 ^{ème} jours post-partum	Naissance à 26 ^{ème} jour post-partum

V. Exemple d'étude d'un perturbateur thyroïdien : le fipronil

A. Présentations et principales utilisations du fipronil

Le fipronil, 5-amino-1-(2,6-dichloro-4-(trifluorométhylphényl))-4-(trifluorométhyl-sulfinyl) pyrazole-3-carbonitrile), est un insecticide à large spectre appartenant à la famille chimique des phénylpyrazoles (Figure 19).

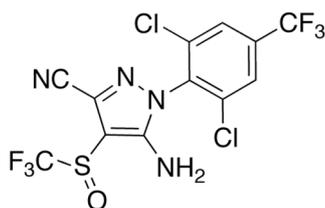


Figure 19 : structure chimique du fipronil

Il agit par blocage non-compétitif des canaux chlorures des récepteurs GABA-A et entraîne une hyperexcitation neuronale chez l'insecte ^{116,117}. Suspecté d'augmenter la mortalité des abeilles, le fipronil est interdit en France depuis 2004 pour son usage phytomédicinal. En Europe, il reste inscrit à l'annexe I de la Directive 94/114/CEE des substances autorisées dans la composition des produits phytomédicinaux. Néanmoins, à la demande de la Commission Européenne, l'EFSA a établi en 2013 un rapport dans lequel elle pointe du doigt le risque potentiel de la molécule vis-à-vis des abeilles, bien que l'absence de certaines données n'aient pas permis l'évaluation complète des risques ¹¹⁸. Outre son utilisation comme produit phytosanitaire, le fipronil est également employé comme antiparasitaire externe chez les animaux domestiques pour son action dirigée en particulier contre les tiques et les puces (ex : Frontline[®]).

B. Données d'exposition humaine

Si les intoxications aiguës au fipronil relèvent de situations accidentelles et sont par conséquent rares, l'exposition de l'Homme à de faibles concentrations est véritablement chronique.

La population générale peut être exposée au fipronil par voie orale au travers de la consommation de denrées ou d'eau de boisson susceptibles de contenir des résidus de fipronil ou de ses métabolites (principalement le fipronil sulfone) ^{119,120}. Malheureusement, les niveaux réels de contamination des

aliments ne sont pas bien documentés et ceci notamment en raison d'un manque de sensibilité analytique. Par conséquent, en 2005, pour estimer l'exposition humaine au fipronil via l'alimentation, l'Afssa (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) a décidé d'adopter une approche maximaliste en remplaçant les valeurs réelles de concentrations en fipronil dans les aliments par les limites maximales de résidus (LMR) autorisées. En combinant les LMR avec les habitudes de consommation alimentaires des français, différents scénarios d'exposition ont été proposés. Chez l'adulte, l'exposition externe a été estimée entre 18% et 100% de la DJA (dose journalière admissible fixée à $0,2 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$ ¹²¹) en fonction des scénarios d'exposition. Chez le nourrisson et le nouveau-né, les études étaient plus inquiétantes avec une estimation de l'exposition pouvant atteindre dans des scénarios maximalistes (ne prenant pas en compte la restriction d'usage de 2004) jusqu'à 800 % de la DJA pour la classe d'âge 0-18 mois, notamment en raison de la très grande consommation de lait, denrée contaminée par le fipronil^{121,122}.

Par ailleurs, la voie cutanée peut également constituer une voie d'entrée chez l'Homme suite à un contact avec des animaux traités au fipronil par spot-on. Les vétérinaires apparaissent comme une profession particulièrement sujette à ce type d'exposition. Il est d'ailleurs recommandé de porter des gants lors de l'application du médicament. Il est également stipulé de limiter les contacts avec l'animal dans les premières heures suivant l'administration, notamment pour les jeunes enfants chez qui les contacts main-bouche sont fréquents.

De plus, les agriculteurs peuvent être exposés par voie respiratoire au fipronil lors du traitement de cultures avec les produits phytosanitaires. De même, dans les usines de conditionnement du fipronil (biocides, médicaments vétérinaires), les employés peuvent inhaler des poussières de ce composé.

La surveillance biologique des salariés s'effectue à partir des concentrations en fiproles. Ce terme générique décrit l'ensemble « fipronil + fipronil sulfone ». En effet, lors de l'incubation avec des microsomes hépatiques humains, le fipronil était principalement métabolisé en fipronil sulfone via une S-oxydation catalysée notamment par le CYP3A4¹²³. Chez le rat traité oralement avec du ¹⁴C-fipronil, le fipronil sulfone représentait plus de 90% de la radioactivité mesurée dans les tissus¹²⁴. D'autres métabolites ont été mis en évidence mais ils restaient très minoritaires (Figure 20).

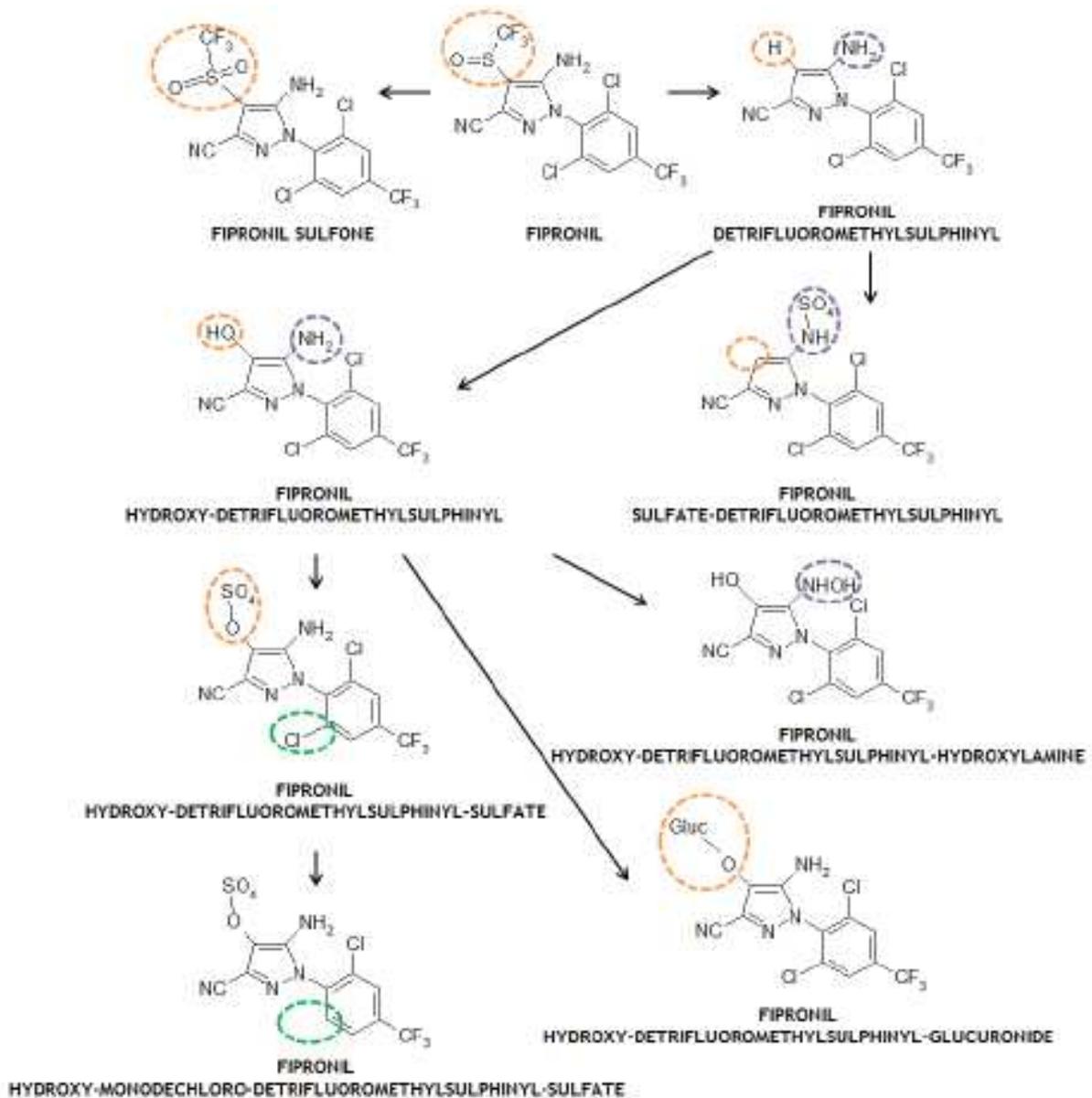


Figure 20 : métabolisme du fipronil chez le rat. Les métabolites ont été identifiés par LC-MS/MS dans l'urine de rats traités par voie orale au ^{14}C -fipronil (10 mg/kg) ^{71,124}

Le suivi du fipronil sulfone est d'autant plus intéressant que celui-ci est éliminé beaucoup plus lentement de l'organisme que la molécule mère. Ainsi, les temps de demi-vie plasmatiques du fipronil et du fipronil sulfone sont respectivement de 4 et 175 h chez le rat ^{71,121}. Cette persistance serait notamment due à une accumulation du fipronil sulfone dans les tissus riches en lipides ¹²⁴. La concentration plasmatique du métabolite semble donc un meilleur témoin du niveau d'exposition.

Selon l'Afssse (Agence Française de Sécurité Sanitaire Environnementale) et l'Afssa, l'exposition des salariés est jugée acceptable lorsque la concentration plasmatique en fiproles est inférieure à 50

ng/mL. Au vu des résultats d'une étude de biosurveillance menée sur 159 employés d'une usine de conditionnement d'un médicament contenant du fipronil ¹²⁵, cette valeur seuil ne semble pas dépassée. En effet, les concentrations plasmatiques de fipronil étaient détectables chez seulement 33 employés (concentration moyenne de $0,47 \pm 0,28$ ng/mL) tandis que les concentrations de fipronil sulfone étaient détectables dans 155 prélèvements et variaient entre 0,37 et 42,45 ng/mL (concentration moyenne de $7,79 \pm 7,65$ ng/mL).

C. Données toxicologiques générales

Chez l'Homme, au regard des quelques cas d'intoxication massive décrits dans la littérature, le fipronil induit essentiellement une irritation des muqueuses oculaire, respiratoire et cutanée. De plus, quelques troubles neurologiques tels que des convulsions (résultant probablement du blocage des récepteurs GABA), des céphalées et des vertiges ont également été rapportés ¹²⁶.

Chez l'animal, la toxicité aiguë du fipronil se manifeste également par des troubles digestifs et neurologiques quelle que soit la voie d'exposition. La dose létale 50 (DL50) est de 92 mg/kg chez le rat. Les études de toxicité chronique ont quant à elles permis de définir une dose sans effet de 0,019 mg.kg⁻¹.j⁻¹ conduisant à une DJA de 0,2 µg.kg⁻¹.j⁻¹ après application d'un facteur de sécurité de 100 ¹²⁶. Chez le chien, une exposition chronique au fipronil entraîne des troubles neurologiques (agressivité, convulsions, hypersalivation). Chez le rat, elle induit en parallèle une atteinte hépatique caractérisée par une hypertrophie hépatique, une dégénérescence des hépatocytes et une modification des paramètres biochimiques hépatiques. La batterie de tests n'a pas révélé de potentiel génotoxique du fipronil, ni d'effets sur le développement et la reproduction.

D. Effets sur la fonction thyroïdienne

Chez le rat, l'exposition à long terme à de fortes doses de fipronil s'est traduite par une augmentation de l'incidence des tumeurs folliculaires thyroïdiennes. C'est pourquoi le fipronil est classé par l'OMS dans la classe II (pesticide modérément dangereux) et dans le groupe C (cancérogène possible chez l'Homme) par l'EPA. En parallèle de ces observations histologiques, les dosages hormonaux ont mis en évidence une augmentation de la concentration sanguine de TSH chez les animaux traités (12,7 mg.kg⁻¹.j⁻¹ chez les mâles et 16,7 mg.kg⁻¹.j⁻¹ chez les femelles) ainsi qu'une diminution des concentrations plasmatiques de T4 chez les mâles dès 0,02 mg.kg⁻¹.j⁻¹ ¹²¹. Une diminution des concentrations sériques de T3 et T4 a également été décrite dans une autre étude sur des rats exposés

au fipronil (5 et 10 mg/kg) après une administration unique ou répétée ¹²⁷. Il est à noter que les altérations hormonales étaient réversibles puisque les concentrations en TSH et T4 étaient comparables au groupe témoin dès la 2^{ème} semaine après l'arrêt du traitement ⁶.

Sur le plan mécanistique, la diminution de la concentration de T4 résulterait d'une augmentation de la clairance de cette hormone, c'est-à-dire de la capacité d'élimination de la T4 par un système biologique, en raison d'une induction par le fipronil des protéines impliquées dans le métabolisme hépatique des hormones thyroïdiennes. Ainsi, chez des rats traités, une augmentation des ARNm codant pour la glucuronotransférase UGT1A1, la sulfotransférase SULT1B1, les transporteurs d'influx (OATP2) et d'efflux (MRP2 et MRP3) des hormones thyroïdiennes dans les hépatocytes a été mise en évidence par RT-PCR ¹²⁸. Les enzymes UGT1A1 et SULT1B1 sont responsables, au niveau hépatique, de la glucuroconjugaison et de la sulfoconjugaison de T3 et T4 facilitant leur élimination rénale et biliaire ^{129,130}.

Cependant, compte-tenu des particularités de la physiologie thyroïdienne chez le rat, il convient de s'interroger du potentiel perturbateur thyroïdien du fipronil chez l'Homme. Une étude de biosurveillance menée sur des employés d'une usine de conditionnement d'un médicament vétérinaire contenant du fipronil a cherché à étudier si l'exposition chronique au fipronil pouvait être associée à des altérations des paramètres de la fonction thyroïdienne ¹²⁵. Les concentrations sériques de fipronil sulfone étaient négativement corrélées avec les concentrations sériques de TSH. Les concentrations sériques de T4 (libre et totale) n'étaient en revanche pas reliées à l'exposition interne en fipronil / fipronil sulfone. Ces résultats suggèrent donc chez l'Homme un éventuel effet inhibiteur direct du fipronil sur la sécrétion de TSH.

Toutefois, pour éclaircir le potentiel perturbateur thyroïdien du fipronil chez l'Homme, il semble nécessaire de compléter ces observations, et ce d'autant plus que des différences interspécifiques marquées existent. Ainsi, si l'augmentation de la clairance de la thyroxine libre est marquée chez le rat ¹³¹ (espèce de référence en toxicologie), cet effet est beaucoup plus modéré chez le mouton ¹³² ou le chien ¹²¹ (espèce dont la physiologie thyroïdienne est proche de la physiologie humaine). Le rat et le mouton se distinguent également par la capacité de métabolisation du fipronil en fipronil sulfone, son principal métabolite. En effet, suite à l'administration de fipronil, le rat se retrouve majoritairement exposé au métabolite au bout de 24 heures alors que la biotransformation est limitée chez le mouton ^{131,132} (Figure 21).

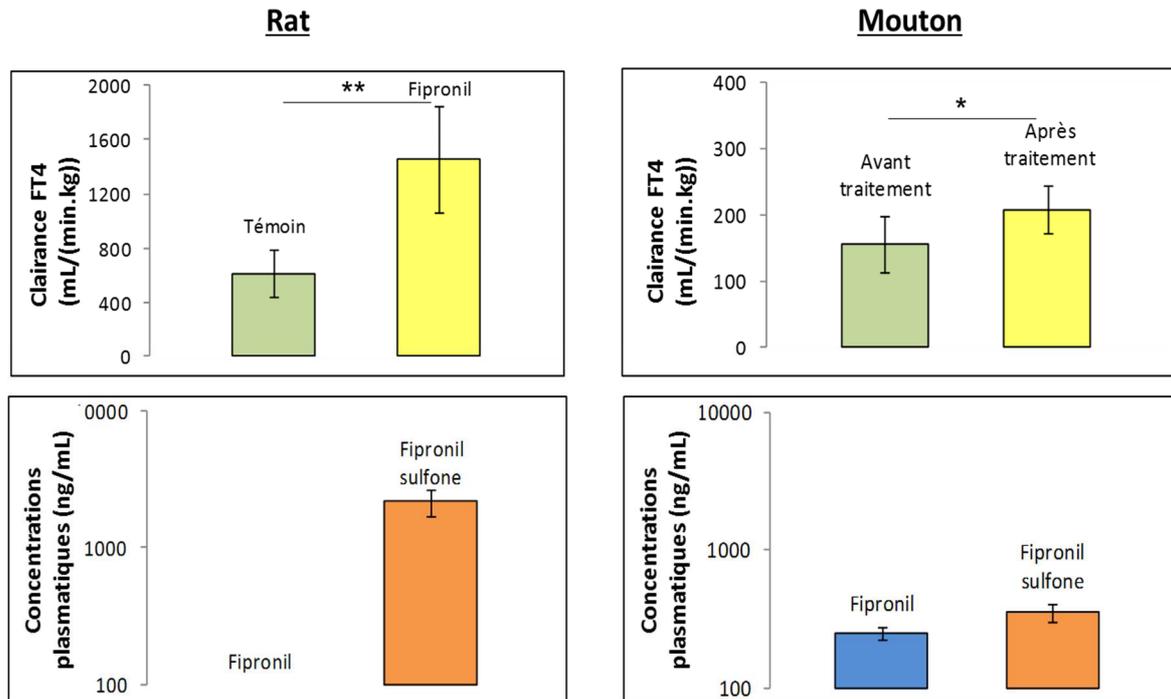


Figure 21 : effet d'un traitement au fipronil ($3 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ VO pendant 14 jours) sur la clairance de la thyroxine libre (graphes du haut) chez le rat (gauche) et le mouton (droite) et exposition interne (concentrations plasmatiques moyennes) au fipronil et son métabolite, le fipronil sulfone. Les effets sont plus marqués sur la T4 chez le rat conjointement à une exposition interne plus importante au fipronil sulfone

E. Problématique

Les différences inter-espèces peuvent s'expliquer par deux hypothèses pouvant être complémentaires l'une de l'autre :

1) l'effet inducteur du fipronil sulfone vis-à-vis du métabolisme hépatique des hormones thyroïdiennes pourrait être supérieur à celui de la molécule mère. Ainsi, les différences interspécifiques de biotransformation du fipronil en fipronil sulfone conduiraient aux différences interspécifiques de sensibilité au potentiel perturbateur thyroïdien du fipronil.

Le taux de biotransformation n'est pas connu chez l'Homme même si des données suggèrent que ce dernier pourrait être plus proche du mouton en termes de transformation du fipronil en fipronil sulfone ¹³³. De ce point de vue, la caractérisation des capacités intrinsèques des hépatocytes à métaboliser le fipronil en fipronil sulfone apparaît comme un point critique dans l'évaluation du risque.

2) ces différences inter-espèces pourraient s'expliquer par des différences à deux niveaux dans les mécanismes régulant le catabolisme périphérique des hormones thyroïdiennes. D'une part, des différences inter-espèces existent dans les systèmes de transport plasmatique des hormones

thyroïdiennes. Ces dernières sont transportées majoritairement par la Thyroxine Binding Globulin (TBG) chez le mouton et l'Homme ^{134,135} alors que chez le rat adulte, la TBG étant absente, le transport des hormones thyroïdiennes est essentiellement assuré par l'albumine et la transthyrétine ^{110,136}. Ces systèmes de transport joueraient un rôle déterminant dans la protection de ces hormones vis-à-vis de leur catabolisme périphérique.

D'autre part, chez la souris, l'induction par le fipronil et le fipronil sulfone de certaines enzymes et transporteurs impliqués dans le catabolisme hépatique des hormones thyroïdiennes est sous la dépendance des récepteurs nucléaires xénosenseurs CAR (Constitutive Androstane Receptor) et PXR (Pregnane X Receptor) ⁷¹ (Figure 22). Ces récepteurs présentent de grandes variations interspécifiques notamment en termes d'affinité pour leur ligand ¹³⁷⁻¹⁴⁰. Les différences interspécifiques de sensibilité au potentiel perturbateur thyroïdien du fipronil pourraient donc être liées à une affinité différentielle du fipronil pour ce type de récepteurs en fonction des espèces.

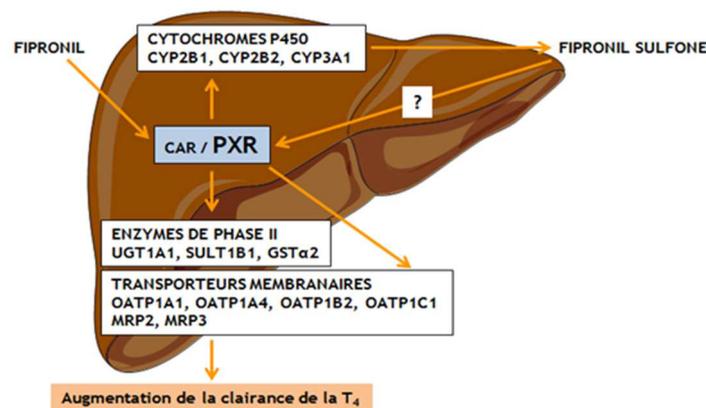


Figure 22 : schéma physiopathologique de la perturbation thyroïdienne engendrée par un traitement au fipronil chez le rat ⁷¹

F. Objectifs

Ces différences interspécifiques dans les mécanismes de régulation du catabolisme périphérique des hormones thyroïdiennes soulignent la difficulté d'extrapoler à l'Homme les effets sur le système thyroïdien d'une exposition au fipronil. L'objectif in fine de ce travail est de fournir des bases scientifiques permettant d'évaluer la pertinence des évaluations du potentiel perturbateur thyroïdien du fipronil chez les rongeurs par rapport à l'Homme.

Afin de pouvoir présager des effets perturbateurs thyroïdiens chez l'Homme, une étude de toxicologie comparative d'espèces du fipronil et du fipronil sulfone a été mise en place par une approche *in vitro*. Le mécanisme primaire de la perturbation thyroïdienne se situant au niveau hépatique et le foie représentant le lieu majeur de la métabolisation du fipronil en fipronil sulfone en particulier sous l'action des CYP3A33,34, le modèle de culture primaire d'hépatocytes a été choisi pour l'étude.

Les objectifs spécifiques de l'étude étaient donc (1) de comparer quantitativement, sur ce modèle d'hépatocytes de rat, espèce sensible de référence, les effets du fipronil et du fipronil sulfone sur la capacité des hépatocytes à éliminer la thyroxine, (2) de comparer le rat et l'Homme en termes de capacités de métabolisation du fipronil en fipronil sulfone et (3) de déterminer si les deux molécules ont les mêmes puissance et efficacité pour induire le métabolisme hépatique des hormones thyroïdiennes chez l'Homme et le rat.

G. Matériels et méthodes

1. Origine et obtention des hépatocytes

Les hépatocytes de rat et d'Homme ont été cryopréservés après collecte à partir d'un foie entier (rat) ou de fragments de foie perfusés (Homme). Les hépatocytes humains ont été obtenus lors de résections de tumeurs hépatiques. Tous les hépatocytes ont été isolés par digestion enzymatique à la collagénase selon le protocole de Berry and Friend ¹⁴¹.

2. Origine et préparation des traitements

Le fipronil (pureté estimée par le fournisseur à 95,6%) a été acheté chez 3B Medical Systems Inc. (Libertyville, IL, USA). Le fipronil sulfone a été synthétisé à partir du fipronil au sein du laboratoire de chimie organique du laboratoire. Les solutions de fipronil ou de fipronil sulfone ont été obtenues dans du milieu de culture William's E après dilution au 1/1000^{ème} des solutions mères respectives de fipronil ou de fipronil sulfone préparées dans le DMSO. Les solutions finales contenaient ainsi 0,1% de DMSO. Le phénobarbital provenait de Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). La solution de phénobarbital 1 mM (témoin positif) a été réalisée par dilution au 1/10^{ème} dans le milieu William's E d'une solution mère à 10 mM préparée dans le mélange milieu William's E / DMSO (1%). Le solvant (témoin négatif) était constitué du milieu William's E supplémenté en DMSO 0,1%.

3. Réactifs de culture

Le milieu L15, le milieu William's E, l'insuline (Insulin-Transferrin-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) et l'érythrosine B et le collagène de chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

4. Mise en culture des hépatocytes

A J0, 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 au minimum de 69%. Les hépatocytes ont ensuite étéensemencés à hauteur de 50 000 cellules viables par puits dans des plaques 96 puits préalablement coatées au collagène de type I. Ils ont ensuite été laissés à incuber à 37°C sous une atmosphère humide chargée à 5% de CO₂. Après une heure d'incubation, le milieu de culture a été remplacé par 100 µL du milieu William's E supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal, 50 UI/mL de pénicilline, 50 µg/mL de streptomycine et 0,1 UI/mL d'insuline. Puis 45 minutes plus tard, le milieu de culture a une nouvelle fois été changé par 100 µL des différents traitements (solvant, phénobarbital 1 mM, fipronil ou fipronil sulfone 0,1 - 0,5 - 1 - 2 - 4 µM). Vingt-quatre heures après la mise en culture, les différents traitements ont été renouvelés et les plaques ont été observées au microscope afin de s'assurer de la bonne adhérence, de la morphologie et de la confluence des hépatocytes (Figure 23).

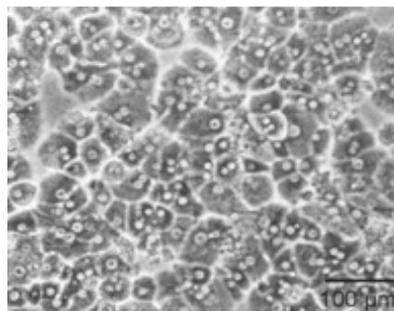


Figure 23 : observation microscopique d'une culture primaire d'hépatocytes de rat

5. Evaluation de la clairance de la thyroxine

a. Prélèvement des milieux extracellulaires

A J2, les milieux ont été remplacés par 100 µL de nouveaux milieux de traitements. La thyroxine, mise en solution dans du DMSO à la concentration de 80 µg/mL, a été ajoutée aux traitements afin d'obtenir une concentration finale de 80 ng/mL (soit une concentration proche de la concentration sérique physiologique en thyroxine totale chez l'Homme). Les traitements ont été préparés dans du milieu William's E non supplémenté en SVF afin d'augmenter la fraction libre et donc biodisponible de thyroxine pour les hépatocytes. Le milieu extracellulaire contenu dans les puits (n=3 puits par condition) a ensuite été récupéré à différents temps de cinétique (0 - 1 - 3 - 5 - 8 - 12 - 18 - 24 heures).

b. Dosage de la thyroxine

La thyroxine totale a ensuite été dosée dans les milieux extracellulaires récupérés aux différents temps grâce à des kits Coat-a-count® de dosage radio-immunologique (Siemens Healthcare Diagnostics, Saint-Denis, France) afin de pouvoir évaluer, pour chaque traitement, l'évolution temporelle des concentrations de thyroxine. Les coefficients moyens intra- et inter-jours pour trois contrôles qualité étaient inférieurs à 15% pour tous les dosages. La limite de quantification était validée à 5 ng/mL.

c. Analyse PK/PD (pharmacocinétique/pharmacodynamique)

L'évolution temporelle des concentrations extracellulaires de thyroxine a été ajustée, à l'aide du logiciel WinNonLin (version 5,3 ; Pharsight corporation), à l'équation :

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

correspondant à un modèle pharmacocinétique d'élimination d'ordre 1. Le paramètre D représente la dose de thyroxine ajoutée dans le puits, V le volume de distribution, K₁₀ la constante d'élimination et t le temps de prélèvement du milieu extracellulaire. Ce modèle a permis d'estimer la clairance de la thyroxine selon la relation :

$$Cl = \frac{D}{AUC}$$

Où Cl représente la clairance intrinsèque de la thyroxine par les hépatocytes en culture, D la quantité de thyroxine ajoutée dans chaque puits et AUC l'aire sous la courbe des concentrations de thyroxine au cours du temps.

Par la suite, un modèle pharmacodynamique de type sigmoïde a permis de représenter la clairance de la thyroxine en fonction de la concentration en fipronil ou en fipronil sulfone à partir de l'équation :

$$E = E_0 + \frac{(E_{max}EC_{50}) \times C^{\gamma}}{C^{\gamma} + EC_{50}^{\gamma}}$$

Ce modèle a permis de définir, pour le fipronil et le fipronil sulfone, l'effet maximal (E_{max}) et la concentration entraînant la moitié de l'effet maximal (EC_{50}) qui représentent respectivement l'efficacité et la puissance des molécules.

6. Dosage du fipronil et du fipronil sulfone

Le fipronil et le fipronil sulfone ont été dosés simultanément dans les milieux extracellulaires récupérés aux différents temps de cinétique par HPLC/MS. 100 μ L d'échantillon ont été complétés avec 50 μ L de standard interne (éthiprole 1 μ g/mL) et 150 μ L d'acétonitrile¹⁴². Les coefficients de variation moyens intra- et inter-jours étaient inférieurs à 15% pour le fipronil et le fipronil sulfone. La limite de quantification (LOQ) était de 2,5 ng/mL pour les deux molécules.

7. Etude de l'expression protéique en In Cell Western

Les anticorps primaires provenaient de Santa Cruz Biotechnology Inc. (Heidelberg, Germany): anticorps de lapin anti- β -actine humain (sc-130657), anticorps de souris anti- β -actine humain (sc-69879), anticorps de souris anti-CYP3A humain (sc-271033), anticorps de lapin anti-UGT1A humain (sc-25847), anticorps de lapin anti-SULT1B1 humain (sc-130273), anticorps de chèvre anti-MRP2 humain (sc-5770), anticorps de chèvre anti-MRP3 humain (sc-5776), anticorps de lapin anti-OATP2 humain (sc-33610). Les anticorps secondaires couplés à des fluorophores infrarouges (excitation à 700 et 800 nm) suivants provenaient d'Interchim (Montluçon, France) : anticorps de chèvre anti-IgG lapin (DZ4030), anticorps de chèvre anti-IgG souris (DZ4070), anticorps de singe anti-IgG chèvre (HV5510).

A J2, un marquage immunofluorescent a été réalisé par *In Cell Western*. Les hépatocytes ont été lavés dans un tampon PBS 1X (Phosphate Buffered Saline), fixés au paraformaldéhyde 4% puis perméabilisés avec du triton 0,2%. Ils ont ensuite été incubés pendant 4 heures avec 50 μ L de deux anticorps primaires

(anticorps anti- β -actine et anticorps dirigé contre la protéine étudiée). Puis après un lavage, 30 μ L du mélange d'anticorps secondaires correspondants et portant des fluorophores émettant dans des longueurs d'onde distinctes ont été ajoutés dans chaque puits. Trente minutes plus tard, les plaques ont été lavées, mises à sec et conservées à 4°C. Le marquage a été révélé sur l'imageur de fluorescence infrarouge Odyssey®.

L'utilisation d'un anticorps dirigé contre la β -actine a permis de normaliser le signal entre les puits afin de pallier aux éventuelles différences inter-puits de cellules. Pour cela, le ratio du signal correspondant au marquage de la protéine étudiée sur le signal correspondant au marquage de la β -actine a été calculé pour chaque puits. Des contrôles ont été réalisés par omission de l'un des deux anticorps secondaires afin de pouvoir déterminer le bruit de fond. La spécificité des différents anticorps primaires avait été évaluée dans des essais précédents⁷¹.

8. Evaluation de la viabilité cellulaire

L'étude de la viabilité cellulaire était primordiale pour s'assurer de l'absence de cytotoxicité engendrée par les différents traitements. Celle-ci a été évaluée grâce au kit de dosage MTT de chez CliniSciences (Nanterre, France). 10 μ l de MTT, un sel de tétrazolium jaune, ont été ajoutés dans chaque puits. Au cours des 4 heures d'incubation, le MTT a pu être converti en cristaux de formazan violet via la succinate deshydrogénase, une enzyme mitochondriale. Les cellules ont ensuite été lysées et la densité optique de chaque puits a été mesurée à 570 et 690 nm. La quantité de précipité formée étant proportionnelle à l'activité mitochondriale et à la quantité de cellules vivantes, la viabilité cellulaire a pu être évaluée par l'intensité du signal obtenu.

Ces conditions de culture (durée de traitement, fréquence de renouvellement de milieu, composition du milieu...) ont fait l'objet d'essais d'optimisation sur des cultures primaires d'hépatocytes de rat pour permettre de reproduire au mieux dans un modèle *in vitro* les effets observés *in vivo*. La Figure 24 présente de façon schématique le protocole mis en place.

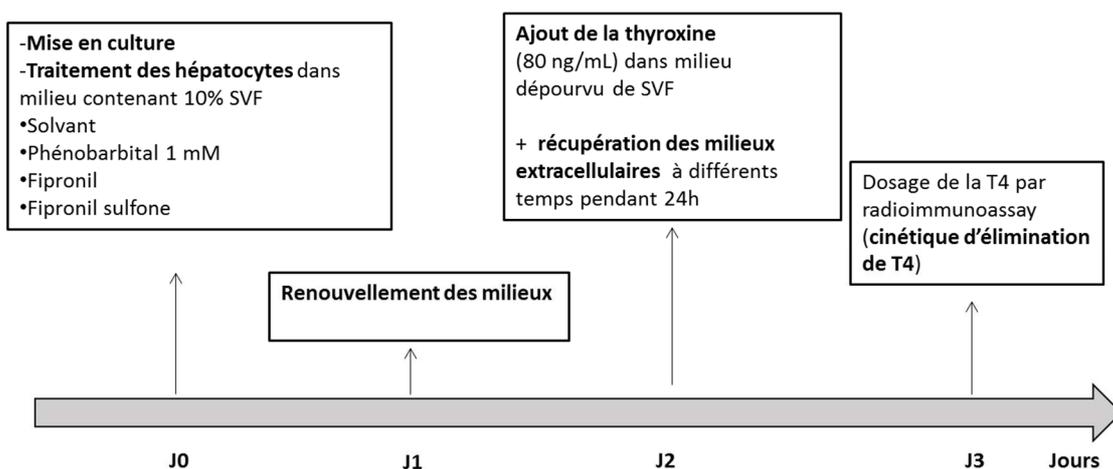


Figure 24 : schéma du protocole expérimental suivi lors des essais de comparaisons inter-espèces de cinétique de T4 et d'expression des protéines du métabolisme hépatique (n=3 puits/condition)

H. Résultats

1. Pharmacodynamie comparative du fipronil et du fipronil sulfone sur le modèle d'hépatocytes de rat

a. Comparaison quantitative : effets sur la clairance de la thyroxine

Les tests de viabilité cellulaire (tests au MTT) réalisés aux temps 0 et 24 heures ont révélé des niveaux d'absorbance similaires entre les traitements et entre les différents temps de cinétique. Cette absence de cytotoxicité a donc permis d'interpréter les effets des différents traitements sur la clairance de la T4 (Figure 25).

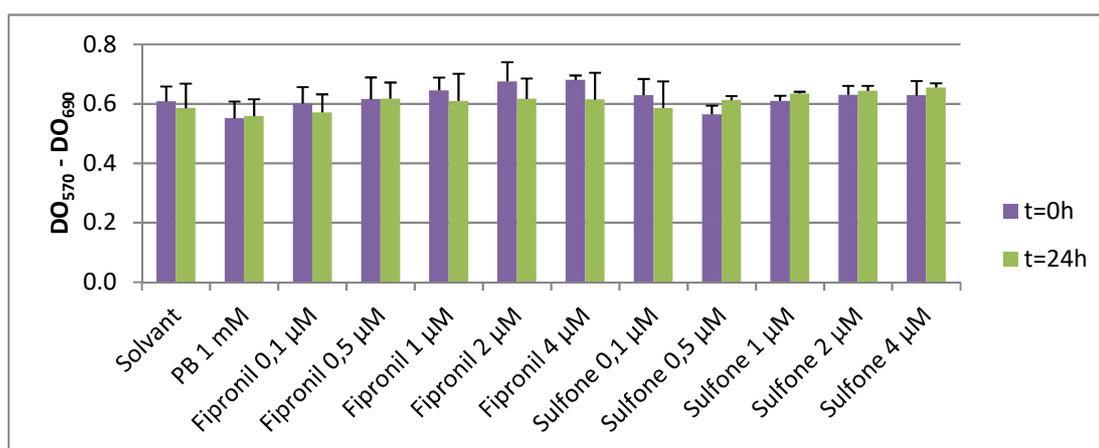


Figure 25 : effets des différents traitements sur la viabilité cellulaire évaluée par un test au MTT (n=3 puits/condition)

Pour le fipronil, l'élimination de la T4 était de plus en plus rapide avec l'augmentation de la concentration du toxique. L'ajustement des données par un modèle pharmacocinétique (Figure 26) a permis d'estimer la clairance de la T4 pour chaque traitement. Puis, le modèle pharmacodynamique (Figure 27), représentant la clairance de T4 en fonction de la concentration en fipronil, a permis de définir une efficacité correspondant à une augmentation de 1,4 fois la clairance de thyroxine totale et une puissance (EC50) de 0,5 µM.

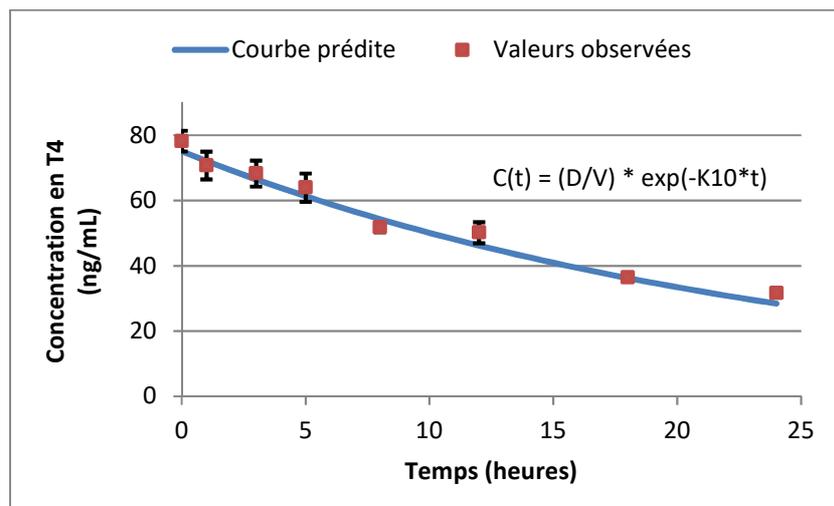


Figure 26 : ajustement de la cinétique d'élimination de la T4 obtenue après exposition de cultures primaires d'hépatocytes de rat au fipronil 0.5µM (n=3 puits/condition)

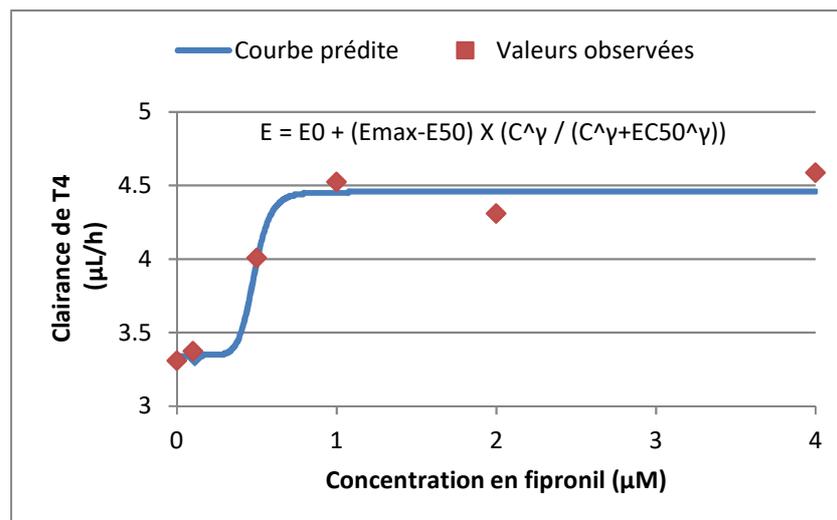


Figure 27 : ajustement de la clairance de T4 en fonction de la concentration en fipronil, obtenue sur des cultures primaires d'hépatocytes de rat (n=3 puits/condition)

Les cinétiques d'élimination de la thyroxine obtenues après traitement au fipronil sulfone n'ont pas mis en évidence de relation dose-dépendante. La plus faible concentration testée (0,1 μ M) entraînait déjà une élimination plus rapide de la T4 par rapport au solvant et les cinétiques étaient très similaires de 0,1 à 4 μ M de fipronil sulfone signifiant que l'effet était déjà maximal à 0,1 μ M. Cet effet était d'une amplitude comparable à celui de l'effet maximal obtenu avec le fipronil. L'analyse PK/PD n'a donc pas permis d'estimer l'EC50 du fipronil sulfone. Toutefois, ces résultats suggèrent que les deux molécules ont la même efficacité (Emax) mais que le fipronil sulfone est au moins 5 fois plus puissant que le fipronil (EC50 à minima 5 fois plus faible).

b. Comparaison qualitative : effets sur l'expression protéique

Des résultats précédents obtenus *in vivo* chez le rat ont montré que le traitement au fipronil et au fipronil sulfone entraînaient une induction du CYP3A et des protéines impliquées dans le catabolisme hépatique des hormones thyroïdiennes ⁷¹. Afin de pouvoir valider le modèle cellulaire, un marquage immunofluorescent (CYP3A ; UGT1A ; SULT1B1 ; MRP2 ; MRP3 ; OATP2) a été réalisé sur des hépatocytes de rat préalablement incubés pendant 48 heures avec du solvant (témoin négatif), du phénobarbital 1 mM (témoin positif), du fipronil ou du fipronil sulfone 1 et 4 μ M.

Le seul résultat concluant concernait le signal correspondant au CYP3A pour lequel une augmentation du signal a pu être mise en évidence pour le fipronil et le fipronil sulfone (Figure 28). De plus, une relation dose-effet semblait exister pour ces deux molécules. Le graphique montre que l'induction obtenue était comparable à celle observée avec le phénobarbital, un inducteur de référence.

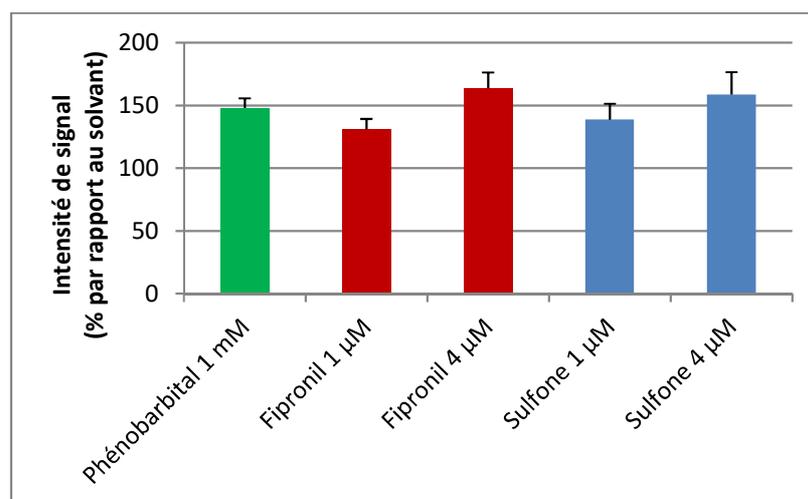


Figure 28 : effets d'un traitement au fipronil ou au fipronil sulfone (1 et 4 μ M) sur l'expression protéique des CYP3A sur des cultures primaires d'hépatocytes de rat (n=3 puits/condition)

Pour les UGT1A1, SULT1B1 aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les traitements. L'immunoréactivité sur OATP2 était trop importante et semblait saturer le signal. Pour les MRP2 et MRP3, aucune immunoréactivité des hépatocytes n'a pu être mise en évidence avec les anticorps utilisés nécessitant de nouvelles optimisations pour conclure.

2. Biotransformation du fipronil en fipronil sulfone

a. Sur le modèle d'hépatocytes de rat

Le fipronil et le fipronil sulfone ont été dosés dans le milieu extracellulaire aux différents temps de prélèvement. Les profils obtenus montraient que le traitement des hépatocytes au fipronil se traduisait par une exposition conjointe au fipronil et au fipronil sulfone reflétant la métabolisation du fipronil en fipronil sulfone (Figure 29). Sur les derniers temps de cinétique, l'exposition au fipronil sulfone était quasi-exclusive. Le fipronil sulfone était présent dans le milieu au début des cinétiques de T4 (i.e. après 48 heures d'exposition au fipronil) : il provenait probablement du transfert du fipronil sulfone formé dans les cellules vers le milieu extracellulaire. Le traitement au fipronil sulfone entraînait quant à lui une exposition exclusive des hépatocytes au fipronil sulfone (Figure 30). En outre, les concentrations évoluaient peu signifiant que le fipronil sulfone, contrairement au fipronil, n'était que très peu dégradé par les hépatocytes.

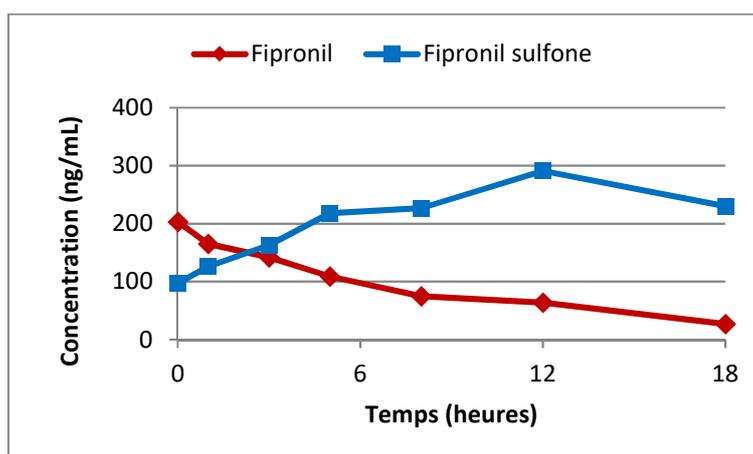


Figure 29 : évolution temporelle des concentrations extracellulaires de fipronil et de fipronil sulfone suite au traitement des hépatocytes au fipronil 0,5 µM

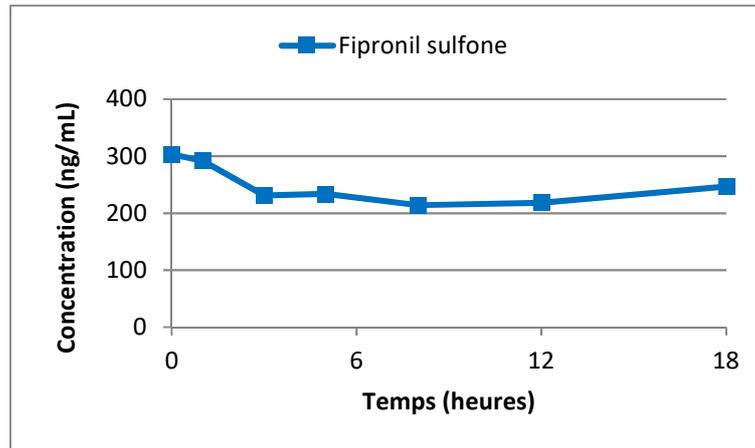


Figure 30 : évolution temporelle des concentrations extracellulaires de fipronil sulfone suite au traitement des hépatocytes au fipronil sulfone 0,5 µM

3. Différences interspécifiques de métabolisation du fipronil en fipronil sulfone

Afin de déterminer si le profil de métabolisation du fipronil chez l'Homme se rapprochait davantage de celui du rat ou du mouton, une comparaison inter-espèce a été réalisée. Des hépatocytes cryopréservés de rat et d'Homme et des hépatocytes frais de mouton ont été mis en culture pendant 24 heures puis incubés pendant 48 heures avec le solvant, le fipronil (0,1 - 0,5 - 1 - 2 - 4 ou 40 µM) ou le fipronil sulfone (0,1 - 0,5 - 1 - 2 ou 4 µM). Les milieux ont été renouvelés au bout de 24 heures de traitement. A J3, soit 24 heures après le renouvellement de milieu, le milieu extracellulaire a été récupéré afin de pouvoir doser le fipronil et le fipronil sulfone et un test au MTT a été effectué.

Sur le modèle d'hépatocytes de rat, le fipronil sulfone était très majoritaire dans le milieu synonyme d'une très forte métabolisation du fipronil en fipronil sulfone (Figure 31). Sur les hépatocytes de mouton, la métabolisation du fipronil en fipronil sulfone était plus faible. Ces résultats étant en accord avec ceux obtenus *in vivo* permettent de valider le modèle cellulaire en termes de métabolisation (Figure 21) Sur les hépatocytes humains, cette biotransformation était quasi-inexistante comme en témoignait l'inversion, par rapport au rat, du ratio fipronil sulfone / fipronil. En revanche, dans les trois espèces, les hépatocytes n'ont pas dégradé le fipronil sulfone puisqu'un traitement au fipronil sulfone entraînait une exposition exclusive au composé correspondant aux concentrations nominales ajoutées dans le milieu.

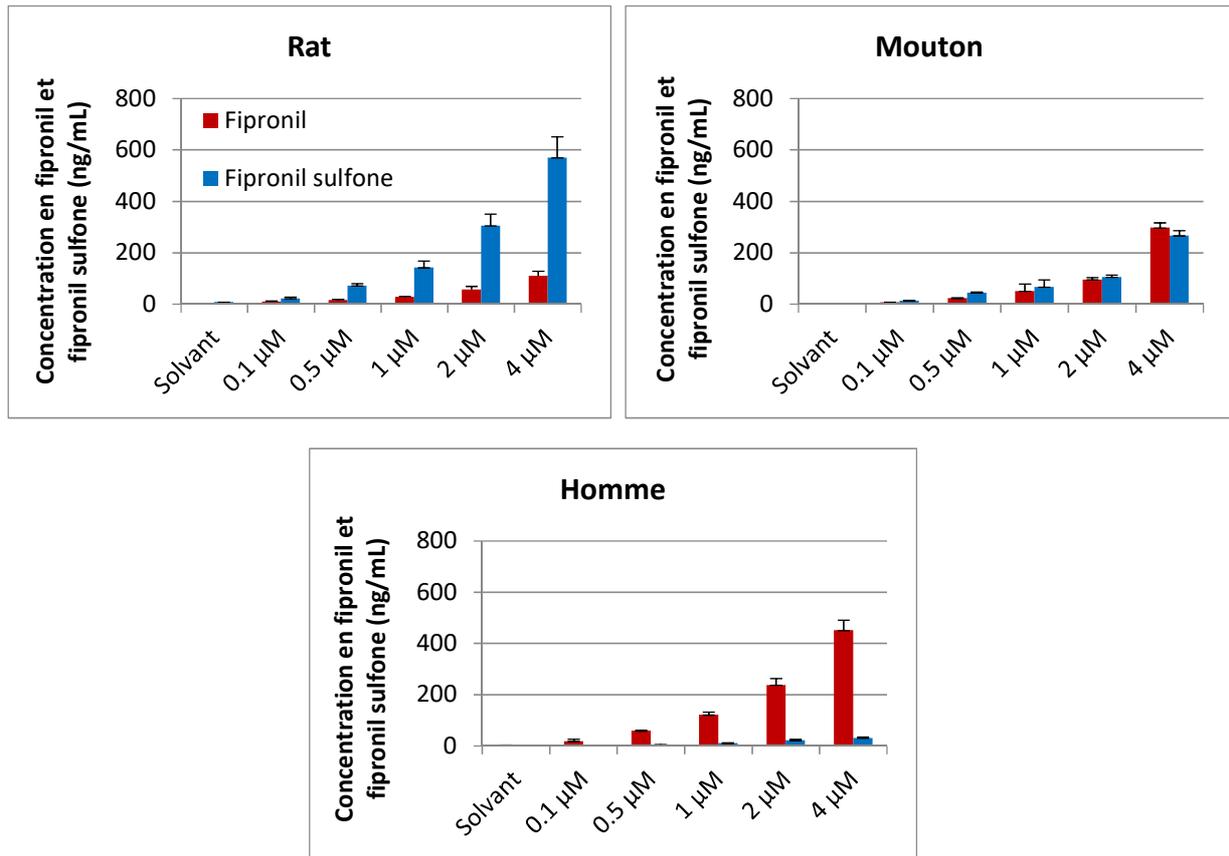


Figure 31 : concentration en fipronil et en fipronil sulfone dans le milieu extracellulaire 24 h après le traitement de cultures primaires d'hépatocytes de rat, de mouton et d'homme par des concentrations croissantes en fipronil (n=3 puits/condition)

Les tests au MTT (Figure 32) ont révélé, pour les trois espèces, une absence de cytotoxicité du fipronil et du fipronil sulfone jusqu'à 4 μM et l'apparition d'un effet cytotoxique à 40 μM de fipronil. Néanmoins, les absorbances obtenues étaient bien plus faibles sur les hépatocytes humains. Une observation directe au microscope indiquait que le nombre de cellules était beaucoup plus faible pour l'Homme. En effet, à J3, les hépatocytes humains n'étaient pas tous à confluence et le tapis cellulaire était moins dense qu'avec les hépatocytes de rat. Cette plus faible viabilité cellulaire expliquerait les plus faibles absorbances obtenues lors du test au MTT. Dans ces conditions, il semblait raisonnable de penser que la faible métabolisation du fipronil en fipronil sulfone, sur le modèle d'hépatocytes humains était due, à un nombre de cellules insuffisant, empêchant de fait toute comparaison avec les deux autres espèces, du moins pour les fortes concentrations. Toutefois, pour les faibles concentrations, la probabilité de saturer les systèmes, malgré le plus faible du nombre de cellules, restait faible. Le maintien d'un ratio fipronil / fipronil sulfone constant laissait donc à penser que les hépatocytes humains ne sulfonent pas beaucoup et qu'ils sont plus proches du modèle ovin.

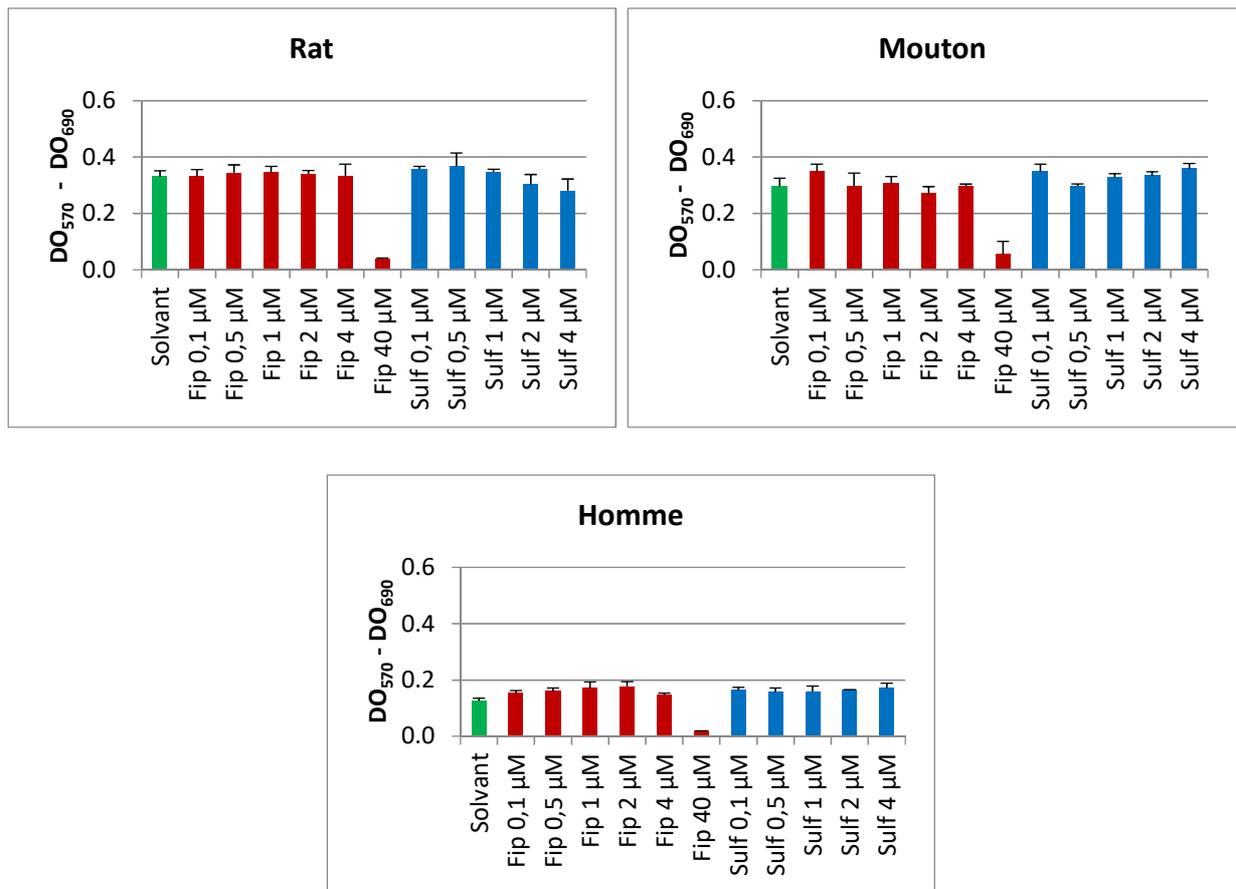


Figure 32 : résultats des tests de viabilité au MTT de cultures primaires d'hépatocytes de rat, de mouton et d'homme suite à l'incubation pendant 48 heures avec des concentrations croissantes de fipronil et de fipronil sulfone (n=3 puits/condition)

Ces problèmes méthodologiques n'ont pas permis de déterminer les effets du fipronil et du fipronil sulfone sur le catabolisme hépatique des hormones thyroïdiennes sur le modèle de culture primaire d'hépatocytes humains et, par conséquent, de comparer les sensibilités respectives de l'Homme et du rat.

I. Discussion et perspectives

1. Pharmacodynamie comparative du fipronil et du fipronil sulfone sur la clairance de la thyroxine

Les cinétiques obtenues sur le modèle d'hépatocytes de rat ont mis en évidence une accélération du catabolisme de la thyroxine suite à un traitement au fipronil et au fipronil sulfone. Ces résultats permettent donc de confirmer sur un modèle cellulaire les propriétés perturbatrices thyroïdiennes de ces deux composés.

L'analyse PK/PD a permis d'estimer une EC50 de 0,5 μM pour le fipronil. Pour le fipronil sulfone, l'effet était déjà maximal à 0,1 μM , concentration du même ordre de grandeur que les concentrations plasmatiques maximales retrouvées chez les personnes travaillant dans les usines de conditionnement du fipronil ¹²⁵. Ces résultats montrent donc que la puissance du fipronil sulfone est au moins 5 fois supérieure à celle du fipronil. Ces observations sont en accord avec les résultats d'une autre étude décrivant, sur un modèle de cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) transfectées avec le promoteur du gène THR β , un effet antagoniste du fipronil sulfone et une absence d'effet du fipronil ¹⁰³.

Ceci est d'autant plus problématique que le fipronil sulfone persiste plus longtemps que le fipronil dans l'organisme. Ainsi, chez le mouton, après un traitement au fipronil, les concentrations plasmatiques en fipronil sulfone semblaient diminuer plus lentement que celles en fipronil et restaient détectables plus longtemps ¹³². La demi-vie estimée du fipronil sulfone suite à une administration de fipronil dans cette espèce est de l'ordre de 7.5 jours vs 2 jours pour le fipronil ¹¹¹. Le fipronil sulfone persiste également plus longtemps dans les sédiments avec un temps de demi-vie de 712 jours vs 18,5 jours pour la molécule mère ^{143,144}.

Ces résultats permettent donc de valider la première hypothèse testée selon laquelle le taux de biotransformation du fipronil en fipronil sulfone conditionnerait, au moins en partie, les perturbations thyroïdiennes observées puisque le fipronil sulfone est au minimum 5 fois plus puissant que le fipronil et est beaucoup plus persistant dans l'organisme. De nouveaux essais sont tout de même nécessaires pour affiner les EC50 des deux composés.

Il est à noter que, comme le montre les profils de métabolisation obtenus, le traitement des hépatocytes de rat au fipronil entraînait une exposition quasi-exclusive au fipronil sulfone sur les dernières heures de cinétique. Il est donc probable que l'EC50 déterminée pour les traitements au fipronil soit un "hybride" de la puissance des deux molécules. Afin de pouvoir bien discriminer les effets du fipronil et du fipronil sulfone, une étude précédente menée au laboratoire avait tenté de réaliser une exposition exclusive au fipronil en bloquant la biotransformation du fipronil en fipronil sulfone par

l'utilisation du piperonyl butoxyde, un inhibiteur des CYP450¹⁴⁵. Cependant, cette molécule entraînait par elle-même des modifications de la clairance de la thyroxine empêchant dès lors son utilisation⁷¹. Pour limiter l'exposition des hépatocytes au fipronil sulfone, il pourrait être intéressant de tester d'autres inhibiteurs du CYP3A4 tels que le kétoconazole ou le miconazole¹⁴⁶.

2. Pharmacodynamie comparative du fipronil et du fipronil sulfone sur l'expression de protéines hépatiques

Le fipronil et le fipronil sulfone induisent similairement, dans ce modèle cellulaire, l'expression des CYP3A. Cette augmentation de l'expression des CYP3A est en accord avec l'induction obtenue par *Tang et al.* sur des supersomes de CYP450 humains¹²³. En outre, chez le rat, l'élimination du fipronil lors d'administrations répétées *in vivo* est de plus en plus rapide au cours des administrations^{111,127} traduisant une induction de l'activité des enzymes impliquées dans le catabolisme du fipronil dont le CYP3A. *In vivo* chez le rat, le fipronil et le fipronil sulfone augmentent également la clairance de l'antipyrine, un marqueur reconnu de l'activité CYP3A⁷¹.

En revanche, aucun effet du fipronil et du fipronil sulfone n'a pu être mis en évidence sur l'expression d'enzymes et de transporteurs impliqués dans le métabolisme des hormones thyroïdiennes. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette absence d'effet.

Pour les MRP2 et MRP3, les anticorps utilisés étaient dirigés contre les épitopes de protéines humaines mais avaient été validés chez le rongeur. Il est donc peu probable que l'absence d'immunoréactivité puisse être due à une trop faible réactivité croisée entre les deux espèces. En revanche, il se peut que les cultures d'hépatocytes utilisées n'expriment pas ou pas suffisamment les transporteurs MRP2 et MRP3. Ainsi, il a été montré d'une part sur un modèle de culture primaire d'hépatocytes de rat, que l'expression des transporteurs d'efflux était diminuée par rapport à l'expression obtenue chez l'animal et que la réponse à des inducteurs pouvait différer de celle obtenue *in vivo*¹⁴⁷. D'autre part, les cultures utilisées contenaient en très grande majorité des hépatocytes et très peu d'autres types cellulaires alors que les transporteurs MRP sont plutôt exprimées dans les cholangiocytes¹⁴⁸.

Pour les UGT1A, on peut s'interroger sur la spécificité de l'anticorps. En effet, sur des essais réalisés précédemment en Western Blot à partir d'extraits tissulaires de foie de rat, plusieurs bandes apparaissaient sur le gel mettant en évidence la reconnaissance de plusieurs isoformes d'UGT1A par l'anticorps primaire. Or, seuls les ARNm codant pour des isoformes spécifiques de l'UGT1A, dont l'UGT1A1, présentaient une augmentation de leur expression⁷¹. Le marquage immunofluorescent réalisé sur les cultures cellulaires ne permettant pas, contrairement au Western Blot, de séparer les

différentes isoformes, le signal spécifique de l'UGT1A1 a pu être "noyé" dans le signal global des UGT1A empêchant la détection d'une éventuelle différence entre les traitements.

Une des principales limites méthodologiques de notre étude réside dans la durée d'exposition des hépatocytes au traitement qui pourrait être insuffisante pour permettre la mise en place des mécanismes d'induction, et en particulier la synthèse des différentes protéines étudiées. Ainsi, une étude *in vitro* sur hépatocytes de rat a montré que le phénobarbital 2 mM, un inducteur de référence, entraînait une augmentation de l'activité de l'UDP-glucuronosyl-transférase seulement à partir du 4ème jour d'exposition¹⁴⁹. Or, lors des phases d'optimisation, il a été mis en évidence une diminution de la viabilité et une dédifférenciation cellulaire à partir de 96 heures, ce qui nous a conduit à limiter la durée totale d'exposition des cellules à 72h. Le maintien d'une viabilité satisfaisante pendant une durée de culture supérieure aurait nécessité l'utilisation de matrices extracellulaires particulières (ex: Matrigel) ou encore le recours à des techniques de cultures en sandwich¹⁴⁹⁻¹⁵¹.

En dépit de cette absence apparente d'effets sur l'expression de protéines clefs du catabolisme hépatique des hormones thyroïdiennes (enzymes et transporteurs) dans nos conditions de culture cellulaire, les conditions utilisées permettaient tout de même de visualiser un effet du fipronil et du fipronil sulfone sur le marqueur biologique ciblé, la clairance de la T4 en accord avec les observations obtenues *in vivo* chez le rat.

Pour pallier aux limites du marquage immunofluorescent, les effets des traitements sur l'expression des transporteurs hépatiques et des enzymes de phase II, pourraient être évalués par PCR quantitatives à partir du matériel intracellulaire. Cette technique permettrait probablement d'observer des effets plus précocement. La mesure de l'activité de l'UDP-GT par rapport à un substrat de référence tel que la 4 para-nitrophénol pourrait également être envisagée¹⁵².

3. Comparaison inter-espèces des effets

Les profils de métabolisation du fipronil en fipronil sulfone obtenus sur le modèle cellulaire chez le rat et le mouton étaient cohérents avec ceux obtenus précédemment *in vivo* apportant la preuve que le modèle *in vitro* permettait bien de reproduire les différences interspécifiques de métabolisation du fipronil.

Malheureusement, en raison de problèmes méthodologiques, la biotransformation du fipronil en fipronil sulfone n'a pas pu être étudiée sur le modèle de culture primaire d'hépatocytes humains. De nouveaux essais de comparaison inter-espèces devront donc être menés ultérieurement même si au

vu des quelques résultats obtenus et des données de biomonitoring de personnes intoxiquées au fipronil¹³³, il semble que l'Homme métabolise peu le fipronil en fipronil sulfone le rendant *a priori* plus proche du modèle mouton et donc moins vulnérable à l'exposition au fipronil.

De même, des essais supplémentaires sur hépatocytes humains seront nécessaires pour déterminer la puissance et l'efficacité du fipronil et du fipronil sulfone sur la clairance de la thyroxine.

Au final, cette étude a donc permis de répondre au premier objectif, à savoir la comparaison des effets perturbateurs thyroïdiens du fipronil et du fipronil sulfone. Ce modèle cellulaire a ainsi pu mettre en évidence sur des cultures primaires d'hépatocytes de rat une plus grande puissance du fipronil sulfone, qui pourrait permettre d'expliquer au moins en partie les différences de perturbation thyroïdienne observées entre le rat et le mouton. Ceci est d'autant plus critique que le fipronil sulfone persiste plus longtemps au sein de l'organisme. En revanche, des essais supplémentaires seront nécessaires pour évaluer la métabolisation du fipronil en fipronil sulfone et les effets de ces deux composés sur la clairance de la thyroxine sur le modèle d'hépatocytes humains. Une fois ces données disponibles, celles-ci permettront de confronter les sensibilités respectives du rat et de l'Homme et d'affiner par la suite, l'évaluation du risque pour la fonction thyroïdienne de l'Homme d'une exposition au fipronil.

VI. Conclusion générale

Les connaissances scientifiques autour des perturbateurs endocriniens ont véritablement progressé depuis les premières observations du milieu du XX^{ème} siècle, décrites notamment dans les best-seller « Silent spring » (1962) de Rachel Carson ou encore un peu plus tard « Our stolen future » (1996) de Theo Colborn, Diane Dumanoski et John Peterson Myers. En effet, une véritable émulsion scientifique est née autour de cette classe de composés permettant d'engranger rapidement une quantité astronomique de données, et ce malgré un climat parfois houleux au sein de la communauté scientifique, comme en témoignent les nombreuses controverses autour du bisphénol A.

Néanmoins, si l'existence des perturbateurs endocriniens semble aujourd'hui démontrée, un énorme travail doit encore être fourni pour mieux comprendre les mécanismes impliqués et identifier de nouveaux composés cibles auxquels l'Homme est exposé. L'EPA a d'ailleurs lancé depuis une dizaine d'années un important programme de screening de composés susceptibles de présenter des propriétés perturbatrices endocriniennes (« Endocrine Disruptor Screening Program »). Cette initiative a pour but d'établir une liste la plus exhaustive possible des perturbateurs endocriniens retrouvés dans l'environnement. Elle a également pour but de répondre à un besoin devenu fondamental, l'accélération du processus d'harmonisation des directives réglementaires et le développement de nouveaux tests toxicologiques spécifiques des perturbateurs endocriniens.

Ce travail devrait permettre de faciliter l'évaluation du risque lié à l'exposition humaine à des perturbateurs endocriniens en apportant des éléments de réponse à la composante « évaluation du danger ». Cependant, le risque correspondant à la combinaison du danger et de l'exposition, une attention particulière doit également être portée à l'estimation de l'exposition humaine. Cette dernière repose sur des estimations basées sur des scénarios d'exposition (ex : panier moyen de consommation) et de données pharmacocinétiques obtenues chez l'animal. Pour cela, il est nécessaire de développer des méthodes analytiques bénéficiant d'une sensibilité suffisante pour doser des composés bien souvent retrouvés seulement à l'état de traces chez l'Homme.

Au final, face à cette problématique de santé actuelle et aux inquiétudes grandissantes de la population, il apparaît clairement que l'amélioration des connaissances autour des perturbateurs endocriniens et l'évaluation du risque qu'ils représentent pour la santé humaine repose sur une multitude de compétences et d'acteurs parmi lesquels le pharmacien semble à même de pouvoir jouer un rôle clé.

VII. Références

1. Bellanger, M., Demeneix, B., Grandjean, P., Zoeller, R. T. & Trasande, L. Neurobehavioral Deficits, Diseases, and Associated Costs of Exposure to Endocrine-Disrupting Chemicals in the European Union. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **100**, 1256–1266 (2015).
2. Melnick, R. *et al.* Summary of the National Toxicology Program’s report of the endocrine disruptors low-dose peer review. *Environ. Health Perspect.* **110**, 427–431 (2002).
3. EFSA. *Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in food stuffs: PART II - Toxicological assessment and risk characterisation.* (2015).
4. Tharp, A. P. *et al.* Bisphenol A alters the development of the rhesus monkey mammary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 8190–8195 (2012).
5. Vandenberg, L. N. *et al.* Exposure to Environmentally Relevant Doses of the Xenoestrogen Bisphenol-A Alters Development of the Fetal Mouse Mammary Gland. *Endocrinology* **148**, 116–127 (2007).
6. Wadia, P. R. *et al.* Low-Dose BPA Exposure Alters the Mesenchymal and Epithelial Transcriptomes of the Mouse Fetal Mammary Gland. *PLoS ONE* **8**, e63902 (2013).
7. Kamrin, M. A. The ‘low dose’ hypothesis: validity and implications for human risk. *Int. J. Toxicol.* **26**, 13–23 (2007).
8. Rhomberg, L. R. & Goodman, J. E. Low-dose effects and nonmonotonic dose–responses of endocrine disrupting chemicals: Has the case been made? *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **64**, 130–133 (2012).
9. Sharpe, R. M. Is It Time to End Concerns over the Estrogenic Effects of Bisphenol A? *Toxicol. Sci.* **114**, 1–4 (2010).
10. Welshons, W. V. *et al.* Large Effects from Small Exposures. I. Mechanisms for Endocrine-Disrupting Chemicals with Estrogenic Activity. *Environ. Health Perspect.* **111**, 994–1006 (2003).

11. Vandenberg, L. N. *et al.* Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocr. Rev.* **33**, 378–455 (2012).
12. Vandenberg, L. N. in *Vitamins & Hormones* **94**, 129–165 (Elsevier, 2014).
13. Zoeller, R. T. *et al.* Endocrine-Disrupting Chemicals and Public Health Protection: A Statement of Principles from The Endocrine Society. *Endocrinology* **153**, 4097–4110 (2012).
14. Zoeller, T. R. Environmental chemicals targeting thyroid. *Horm. Athens* **9**, 28–40 (2010).
15. Kohn, M. C. & Melnick, R. L. Biochemical origins of the non-monotonic receptor-mediated dose-response. *J. Mol. Endocrinol.* **29**, 113–123 (2002).
16. Vom Saal, F. S. *et al.* Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 2056–2061 (1997).
17. Beausoleil, C. *et al.* Low dose effects and non-monotonic dose responses for endocrine active chemicals: Science to practice workshop: Workshop summary. *Chemosphere* **93**, 847–856 (2013).
18. Delclos, K. B. *et al.* Effects of dietary genistein exposure during development on male and female CD (Sprague-Dawley) rats. *Reprod. Toxicol.* **15**, 647–663 (2001).
19. Calafat, A. M. *et al.* Exposure to Bisphenol A and Other Phenols in Neonatal Intensive Care Unit Premature Infants. *Environ. Health Perspect.* **117**, 639–644 (2009).
20. Kim, S. *et al.* Association between Several Persistent Organic Pollutants and Thyroid Hormone Levels in Cord Blood Serum and Bloodspot of the Newborn Infants of Korea. *PLoS One* **10**, e0125213 (2015).
21. Fisher, M. *et al.* Concentrations of persistent organic pollutants in maternal and cord blood from the maternal-infant research on environmental chemicals (MIREC) cohort study. *Environ. Health Glob. Access Sci. Source* **15**, 59 (2016).
22. Richter, C. A. *et al.* In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod. Toxicol. Elmsford NY* **24**, 199 (2007).

23. de Cock, M., Maas, Y. G. H. & van de Bor, M. Does perinatal exposure to endocrine disruptors induce autism spectrum and attention deficit hyperactivity disorders? Review. *Acta Paediatr. Oslo Nor. 1992* **101**, 811–818 (2012).
24. Fudvoye, J., Bourguignon, J.-P. & Parent, A.-S. in *Vitamins & Hormones* **94**, 1–25 (Elsevier, 2014).
25. Corbel, T. *et al.* Conjugation and Deconjugation Reactions within the Fetoplacental Compartment in a Sheep Model: A Key Factor Determining Bisphenol A Fetal Exposure. *Drug Metab. Dispos.* **43**, 467–476 (2015).
26. Doerge, D. R., Twaddle, N. C., Vanlandingham, M., Brown, R. P. & Fisher, J. W. Distribution of bisphenol A into tissues of adult, neonatal, and fetal Sprague–Dawley rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **255**, 261–270 (2011).
27. Taylor, J. A., Welshons, W. V. & vom Saal, F. S. No Effect of Route of Exposure (Oral; Subcutaneous Injection) on Plasma Bisphenol A throughout 24 hr after Administration in Neonatal Female Mice. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* **25**, 169–176 (2008).
28. Isoherranen, N. & Thummel, K. E. Drug metabolism and transport during pregnancy: how does drug disposition change during pregnancy and what are the mechanisms that cause such changes? *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **41**, 256–262 (2013).
29. Vessey, M. P. Epidemiological studies of the effects of diethylstilboestrol. *IARC Sci. Publ.* 335–348 (1989).
30. Blanc, B., Bretelle, F. & Agostini, A. *Le Distilbène trente ans après: Les enfants des 2èmes et 3èmes générations*. (Springer Science & Business Media, 2008).
31. Fénichel, P., Brucker-Davis, F. & Chevalier, N. The history of Distilbène® (Diethylstilbestrol) told to grandchildren--the transgenerational effect. *Ann. Endocrinol.* **76**, 253–259 (2015).
32. Liew, Z. *et al.* Attention Deficit/Hyperactivity Disorder and Childhood Autism in Association with Prenatal Exposure to Perfluoroalkyl Substances: A Nested Case–Control Study in the Danish National Birth Cohort. *Environ. Health Perspect.* (2014). doi:10.1289/ehp.1408412

33. Roberts, E. M. *et al.* Maternal Residence Near Agricultural Pesticide Applications and Autism Spectrum Disorders Among Children in the California Central Valley. *Environ. Health Perspect.* (2007). doi:10.1289/ehp.10168
34. Klip, H. *et al.* Hypospadias in sons of women exposed to diethylstilbestrol in utero: a cohort study. *Lancet Lond. Engl.* **359**, 1102–1107 (2002).
35. Kalfa, N., Paris, F., Soyer-Gobillard, M.-O., Daures, J.-P. & Sultan, C. Prevalence of hypospadias in grandsons of women exposed to diethylstilbestrol during pregnancy: a multigenerational national cohort study. *Fertil. Steril.* **95**, 2574–2577 (2011).
36. Titus-Ernstoff, L. *et al.* Offspring of women exposed in utero to diethylstilbestrol (DES): a preliminary report of benign and malignant pathology in the third generation. *Epidemiol. Camb. Mass* **19**, 251–257 (2008).
37. Titus-Ernstoff, L. *et al.* Birth defects in the sons and daughters of women who were exposed in utero to diethylstilbestrol (DES). *Int. J. Androl.* **33**, 377–384 (2010).
38. Skinner, M. K. Endocrine disruptors in 2015: Epigenetic transgenerational inheritance. *Nat. Rev. Endocrinol.* **12**, 68–70 (2016).
39. Anway, M. D., Cupp, A. S., Uzumcu, M. & Skinner, M. K. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* **308**, 1466–1469 (2005).
40. Ziv-Gal, A., Wang, W., Zhou, C. & Flaws, J. A. The effects of in utero bisphenol A exposure on reproductive capacity in several generations of mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **284**, 354–362 (2015).
41. Berger, A. *et al.* The effects of in utero bisphenol A exposure on the ovaries in multiple generations of mice. *Reprod. Toxicol.* **60**, 39–52 (2016).
42. Bhaskar, R. & Mohanty, B. Pesticides in mixture disrupt metabolic regulation: in silico and in vivo analysis of cumulative toxicity of mancozeb and imidacloprid on body weight of mice. *Gen. Comp. Endocrinol.* **205**, 226–234 (2014).

43. Pop, A. *et al.* Individual and combined in vitro (anti)androgenic effects of certain food additives and cosmetic preservatives. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* **32**, 269–277 (2016).
44. Lea, R. G. *et al.* The fetal ovary exhibits temporal sensitivity to a ‘real-life’ mixture of environmental chemicals. *Sci. Rep.* **6**, 22279 (2016).
45. Hanioka, N., Naito, T. & Narimatsu, S. Human UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in bisphenol A glucuronidation. *Chemosphere* **74**, 33–36 (2008).
46. Mazur, C. S., Kenneke, J. F., Hess-Wilson, J. K. & Lipscomb, J. C. Differences between Human and Rat Intestinal and Hepatic Bisphenol A Glucuronidation and the Influence of Alamethicin on In Vitro Kinetic Measurements. *Drug Metab. Dispos.* **38**, 2232–2238 (2010).
47. Gilbert, M. E., Rovet, J., Chen, Z. & Koibuchi, N. Developmental thyroid hormone disruption: Prevalence, environmental contaminants and neurodevelopmental consequences. *Neurotoxicology* **33**, 842–852 (2012).
48. Gutleb, A. C., Cambier, S. & Serchi, T. Impact of Endocrine Disruptors on the Thyroid Hormone System. *Horm. Res. Paediatr.* (2016). doi:10.1159/000443501
49. Sharma, V. *et al.* Effects of Reginoids on Thyrotrope Function and the Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis. *Endocrinology* **147**, 1438–1451 (2006).
50. Decherf, S., Seugnet, I., Fini, J.-B., Clerget-Froidevaux, M.-S. & Demeneix, B. A. Disruption of thyroid hormone-dependent hypothalamic set-points by environmental contaminants. *Mol. Cell. Endocrinol.* **323**, 172–182 (2010).
51. Tonacchera, M. *et al.* 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**, 1012–1019 (2004).
52. Breous, E., Wenzel, A. & Loos, U. The promoter of the human sodium/iodide symporter responds to certain phthalate plasticisers. *Mol. Cell. Endocrinol.* **244**, 75–78 (2005).
53. Patrick, L. Thyroid disruption: mechanisms and clinical implications in human health. *Altern. Med. Rev.* **14**, 326–347 (2009).

-
54. Crofton, K. M. *et al.* Thyroid-Hormone-Disrupting Chemicals: Evidence for Dose-Dependent Additivity or Synergism. *Environ. Health Perspect.* **113**, 1549–1554 (2005).
 55. Schmutzler, C. *et al.* The Ultraviolet Filter Benzophenone 2 Interferes with the Thyroid Hormone Axis in Rats and Is a Potent *in Vitro* Inhibitor of Human Recombinant Thyroid Peroxidase. *Endocrinology* **148**, 2835–2844 (2007).
 56. Larsen, P. R., Davies, T. F., Schlumberger, M.-J. & Hay, I. D. in *Williams Textbook of Endocrinology* 331–373 (Saunders, 2002).
 57. Karami-Tehrani, F., Salami, S. & Mokarram, P. Competition of tamoxifen with thyroxine for TBG binding: ligand binding assay and computational data. *Clin. Biochem.* **34**, 603–606 (2001).
 58. Boas, M., Feldt-Rasmussen, U. & Main, K. M. Thyroid effects of endocrine disrupting chemicals. *Mol. Cell. Endocrinol.* **355**, 240–248 (2012).
 59. Meerts, I. A. *et al.* Potent competitive interactions of some brominated flame retardants and related compounds with human transthyretin *in vitro*. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **56**, 95–104 (2000).
 60. Weiss, J. M. *et al.* Competitive binding of poly- and perfluorinated compounds to the thyroid hormone transport protein transthyretin. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **109**, 206–216 (2009).
 61. Curran, P. G. & DeGroot, L. J. The effect of hepatic enzyme-inducing drugs on thyroid hormones and the thyroid gland. *Endocr. Rev.* **12**, 135–150 (1991).
 62. Bianco, A. C. & Kim, B. W. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J. Clin. Invest.* **116**, 2571–2579 (2006).
 63. Bianco, A., Salvatore, D., Gereben, B., Berry, M. & Larsen, P. Biochemistry, Cellular and Molecular Biology, and Physiological Roles of the Iodothyronine Selenodeiodinases. *Endocr. Rev.* **23**, 38–89 (2002).
 64. Klammer, H. *et al.* Effects of a 5-day treatment with the UV-filter octyl-methoxycinnamate (OMC) on the function of the hypothalamo-pituitary–thyroid function in rats. *Toxicology* **238**, 192–199 (2007).

-
65. Morse *et al.* Interference of polychlorinated bisphenyls in hepatic and brain thyroid hormone metabolism in fetal and neonatal rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **122**, 27–33
 66. Viluksela, M., Raasmaja, A., Lebofsky, M., Stahl, B. U. & Rozman, K. K. Tissue-specific effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on the activity of 5'-deiodinases I and II in rats. *Toxicol. Lett.* **147**, 133–142 (2004).
 67. Zhou, L. X. *et al.* Cytochrome P450 catalyzed covalent binding of methoxychlor to rat hepatic, microsomal iodothyronine 5'-monodeiodinase, type I: does exposure to methoxychlor disrupt thyroid hormone metabolism? *Arch. Biochem. Biophys.* **322**, 390–394 (1995).
 68. Crofton, K. M. Thyroid disrupting chemicals: mechanisms and mixtures. *Int. J. Androl.* **31**, 209–223 (2008).
 69. Schuur, A. G., Brouwer, A., Bergman, A., Coughtrie, M. W. & Visser, T. J. Inhibition of thyroid hormone sulfation by hydroxylated metabolites of polychlorinated biphenyls. *Chem. Biol. Interact.* **109**, 293–297 (1998).
 70. Nishimura, N., Yonemoto, J., Miyabara, Y., Sato, M. & Tohyama, C. Rat thyroid hyperplasia induced by gestational and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Endocrinology* **144**, 2075–2083 (2003).
 71. Roques, B. Bases mécanistiques des effets d'un insecticide agrovétérinaire, le fipronil, et/ou de ses métabolites sur la fonction thyroïdiennes chez le rat. (2012).
 72. Friesema, E. C. H. *et al.* Association between mutations in a thyroid hormone transporter and severe X-linked psychomotor retardation. *Lancet Lond. Engl.* **364**, 1435–1437 (2004).
 73. Ceballos, A. *et al.* Importance of monocarboxylate transporter 8 for the blood-brain barrier-dependent availability of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine. *Endocrinology* **150**, 2491–2496 (2009).
 74. Mayerl, S. *et al.* Transporters MCT8 and OATP1C1 maintain murine brain thyroid hormone homeostasis. *J. Clin. Invest.* **124**, 1987–1999 (2014).

75. Richardson, V. M. *et al.* Possible mechanisms of thyroid hormone disruption in mice by BDE 47, a major polybrominated diphenyl ether congener. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **226**, 244–250 (2008).
76. Shimada, N. & Yamauchi, K. Characteristics of 3,5,3'-triiodothyronine (T3)-uptake system of tadpole red blood cells: effect of endocrine-disrupting chemicals on cellular T3 response. *J. Endocrinol.* **183**, 627–637 (2004).
77. Jugan, M.-L., Levi, Y. & Blondeau, J.-P. Endocrine disruptors and thyroid hormone physiology. *Biochem. Pharmacol.* **79**, 939–947 (2010).
78. Miyazaki, W., Iwasaki, T., Takeshita, A., Kuroda, Y. & Koibuchi, N. Polychlorinated biphenyls suppress thyroid hormone receptor-mediated transcription through a novel mechanism. *J. Biol. Chem.* **279**, 18195–18202 (2004).
79. Kojima, H. *et al.* Nuclear Hormone Receptor Activity of Polybrominated Diphenyl Ethers and Their Hydroxylated and Methoxylated Metabolites in Transactivation Assays Using Chinese Hamster Ovary Cells. *Environ. Health Perspect.* **117**, 1210–1218 (2009).
80. Fini, J.-B. *et al.* An in vivo multiwell-based fluorescent screen for monitoring vertebrate thyroid hormone disruption. *Environ. Sci. Technol.* **41**, 5908–5914 (2007).
81. Bernal, J. in *Endotext* (eds. De Groot, L. J. *et al.*) (MDText.com, Inc., 2015).
82. Madeira, M. D., Paula-Barbosa, M., Cadete-Leite, A. & Tavares, M. A. Unbiased estimate of cerebellar granule cell numbers in hypothyroid and in sex-age-matched control rats. *J. Für Hirnforsch.* **29**, 587–594 (1988).
83. Nicholson, J. L. & Altman, J. The effects of early hypo- and hyperthyroidism on the development of rat cerebellar cortex. I. Cell proliferation and differentiation. *Brain Res.* **44**, 13–23 (1972).
84. Madeira, M. D., Paula-Barbosa, M., Cadete-Leite, A. & Tavares, M. A. Unbiased estimate of hippocampal granule cell numbers in hypothyroid and in sex-age-matched control rats. *J. Für Hirnforsch.* **29**, 643–650 (1988).

85. Lavado-Autric, R. *et al.* Early maternal hypothyroxinemia alters histogenesis and cerebral cortex cytoarchitecture of the progeny. *J. Clin. Invest.* **111**, 1073–1082 (2003).
86. Horn, S. & Heuer, H. Thyroid hormone action during brain development: more questions than answers. *Mol. Cell. Endocrinol.* **315**, 19–26 (2010).
87. Shimokawa, N. *et al.* Altered Cerebellum Development and Dopamine Distribution in a Rat Genetic Model with Congenital Hypothyroidism. *J. Neuroendocrinol.* **26**, 164–175 (2014).
88. Fauquier, T. *et al.* Purkinje cells and Bergmann glia are primary targets of the TR 1 thyroid hormone receptor during mouse cerebellum postnatal development. *Development* **141**, 166–175 (2014).
89. Sharlin, D. S., Tighe, D., Gilbert, M. E. & Zoeller, R. T. The Balance between Oligodendrocyte and Astrocyte Production in Major White Matter Tracts Is Linearly Related to Serum Total Thyroxine. *Endocrinology* **149**, 2527–2536 (2008).
90. Calzà, L., Fernández, M. & Giardino, L. Role of the Thyroid System in Myelination and Neural Connectivity. *Compr. Physiol.* 1405–1421 (2015).
91. Malone, M. J., Rosman, N. P., Szoke, M. & Davis, D. Myelination of brain in experimental hypothyroidism. An electron-microscopic and biochemical study of purified myelin isolates. *J. Neurol. Sci.* **26**, 1–11 (1975).
92. Yu, L. *et al.* Aberrant cerebellar development of transgenic mice expressing dominant-negative thyroid hormone receptor in cerebellar Purkinje cells. *Endocrinology* **156**, 1565–1576 (2015).
93. Morreale de Escobar, G., Obregon, M. J. & Escobar del Rey, F. Is Neuropsychological Development Related to Maternal Hypothyroidism or to Maternal Hypothyroxinemia? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**, 3975–3987 (2000).
94. Pinson, A., Bourguignon, J. P. & Parent, A. S. Exposure to endocrine disrupting chemicals and neurodevelopmental alterations. *Andrology* n/a–n/a (2016). doi:10.1111/andr.12211
95. Stewart, P. W. *et al.* The Relationship between Prenatal PCB Exposure and Intelligence (IQ) in 9-Year-Old Children. *Environ. Health Perspect.* **116**, 1416–1422 (2008).

-
96. Herbstman, J. B. *et al.* Prenatal Exposure to PBDEs and Neurodevelopment. *Environ. Health Perspect.* **118**, 712–719 (2010).
 97. Herbstman, J. B. *et al.* Birth Delivery Mode Modifies the Associations between Prenatal Polychlorinated Biphenyl (PCB) and Polybrominated Diphenyl Ether (PBDE) and Neonatal Thyroid Hormone Levels. *Environ. Health Perspect.* **116**, 1376–1382 (2008).
 98. Gutleb, A. C., Meerts, I. A. T. M., Bergsma, J. H., Schriks, M. & Murk, A. J. T-Screen as a tool to identify thyroid hormone receptor active compounds. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **19**, 231–238 (2005).
 99. Freitas, J. *et al.* Detection of thyroid hormone receptor disruptors by a novel stable in vitro reporter gene assay. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* **25**, 257–266 (2011).
 100. Moriyama, K. *et al.* Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 5185–5190 (2002).
 101. Wu, Y., Beland, F. A. & Fang, J.-L. Effect of triclosan, triclocarban, 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether, and bisphenol A on the iodide uptake, thyroid peroxidase activity, and expression of genes involved in thyroid hormone synthesis. *Toxicol. In Vitro* (2016). doi:10.1016/j.tiv.2016.01.014
 102. Freitas, J. *et al.* Identification of Thyroid Hormone Receptor Active Compounds Using a Quantitative High-Throughput Screening Platform. *Curr. Chem. Genomics Transl. Med.* **8**, 36–46 (2014).
 103. Lu, M. *et al.* Endocrine disrupting potential of fipronil and its metabolite in reporter gene assays. *Chemosphere* **120**, 246–251 (2015).
 104. Heimeier, R. A. & Shi, Y.-B. Amphibian metamorphosis as a model for studying endocrine disruption on vertebrate development: Effect of bisphenol A on thyroid hormone action. *Gen. Comp. Endocrinol.* **168**, 181–189 (2010).
 105. Li, S., Li, M., Wang, Q., Gui, W. & Zhu, G. Exposure to butachlor causes thyroid endocrine disruption and promotion of metamorphosis in *Xenopus laevis*. *Chemosphere* **152**, 158–165 (2016).

106. Schriks, M., Zvinavashe, E., Furlow, J. D. & Murk, A. J. Disruption of thyroid hormone-mediated *Xenopus laevis* tadpole tail tip regression by hexabromocyclododecane (HBCD) and 2,2',3,3',4,4',5,5',6-nona brominated diphenyl ether (BDE206). *Chemosphere* **65**, 1904–1908 (2006).
107. Iwamuro, S. *et al.* Teratogenic and anti-metamorphic effects of bisphenol A on embryonic and larval *Xenopus laevis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **133**, 189–198 (2003).
108. Terrien, X., Fini, J.-B., Demeneix, B. A., Schramm, K.-W. & Prunet, P. Generation of fluorescent zebrafish to study endocrine disruption and potential crosstalk between thyroid hormone and corticosteroids. *Aquat. Toxicol.* **105**, 13–20 (2011).
109. Denver, R. J. in *Current Topics in Developmental Biology* **103**, 195–227 (Elsevier, 2013).
110. Vranckx, R. *et al.* Regulation of rat thyroxine-binding globulin and transthyretin: studies in thyroidectomized and hypophysectomized rats given tri-iodothyronine or/and growth hormone. *J. Endocrinol.* **142**, 77–84 (1994).
111. Leghait, J. Evaluation du potentiel perturbateur thyroïdien du fipronil chez deux espèces: le rat et le mouton. (Université de Toulouse III Paul Sabatier, 2008).
112. Döhler, K. D., Wong, C. C. & von zur Mühlen, A. The rat as model for the study of drug effects on thyroid function: consideration of methodological problems. *Pharmacol. Ther. [B]* **5**, 305–318 (1979).
113. Wu, K.-M. & Farrelly, J. G. Preclinical development of new drugs that enhance thyroid hormone metabolism and clearance: inadequacy of using rats as an animal model for predicting human risks in an IND and NDA. *Am. J. Ther.* **13**, 141–144 (2006).
114. Oppenheimer, J. H. & Schwartz, H. L. Molecular Basis of Thyroid Hormone-Dependent Brain Development 1. *Endocr. Rev.* **18**, 462–475 (1997).
115. Fisher, D. A., Dussault, J. H., Sack, J. & Chopra, I. J. Ontogenesis of hypothalamic--pituitary--thyroid function and metabolism in man, sheep, and rat. *Recent Prog. Horm. Res.* **33**, 59–116 (1976).

-
116. Hainzl, D., Cole, L. M. & Casida, J. E. Mechanisms for selective toxicity of fipronil insecticide and its sulfone metabolite and desulfinyl photoproduct. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 1529–1535 (1998).
117. Ikeda, T. *et al.* Fipronil Modulation of γ -Aminobutyric Acid Receptors in Rat Dorsal Root Ganglion Neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **296**, 914–921 (2001).
118. European Food Safety Authority. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance fipronil: Peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance fipronil. *EFSA J.* **11**, 3158 (2013).
119. Kumar, R. & Singh, B. Persistence and metabolism of Fipronil in rice (*Oryza sativa* Linnaeus) field. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **90**, 482–488 (2013).
120. Aajoud, A., Raveton, M., Aouadi, H., Tissut, M. & Ravanel, P. Uptake and xylem transport of fipronil in sunflower. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 5055–5060 (2006).
121. Afssa & Afsse. *Evaluation des risques pour la santé humaine liés à une exposition au fipronil.* (2005).
122. Le Faouder, J. *et al.* Transfer assessment of fipronil residues from feed to cow milk. *Talanta* **73**, 710–717 (2007).
123. Tang, J., Amin Usmani, K., Hodgson, E. & Rose, R. L. In vitro metabolism of fipronil by human and rat cytochrome P450 and its interactions with testosterone and diazepam. *Chem. Biol. Interact.* **147**, 319–329 (2004).
124. Cravedi, J. P., Delous, G., Zalko, D., Viguié, C. & Debrauwer, L. Disposition of fipronil in rats. *Chemosphere* **93**, 2276–2283 (2013).
125. Herin, F. *et al.* Thyroid function tests in persons with occupational exposure to fipronil. *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* **21**, 701–706 (2011).
126. INRS. Base de données Fiches Toxicologiques - Fipronil. (2016).
127. Moser, V. C. *et al.* Assessment of serum biomarkers in rats after exposure to pesticides of different chemical classes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **282**, 161–174 (2015).

128. Roques, B. B. *et al.* The nuclear receptors pregnane X receptor and constitutive androstane receptor contribute to the impact of fipronil on hepatic gene expression linked to thyroid hormone metabolism. *Biochem. Pharmacol.* **86**, 997–1039 (2013).
129. Mackenzie, P. I. *et al.* Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenet. Genomics* **15**, 677–685 (2005).
130. Kester, M. H. A. *et al.* Characterization of rat iodothyronine sulfotransferases. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **285**, E592–598 (2003).
131. Leghait, J. *et al.* Fipronil-induced disruption of thyroid function in rats is mediated by increased total and free thyroxine clearances concomitantly to increased activity of hepatic enzymes. *Toxicology* **255**, 38–44 (2009).
132. Leghait, J., Gayrard, V., Toutain, P.-L., Picard-Hagen, N. & Viguié, C. 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 (2010).
133. Mohamed, F. *et al.* Acute human self-poisoning with the N-phenylpyrazole insecticide fipronil-a GABAA-gated chloride channel blocker. *Clin. Toxicol.* **42**, 955–963 (2004).
134. Bartalena, L. & Robbins, J. Variations in thyroid hormone transport proteins and their clinical implications. *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* **2**, 237–245 (1992).
135. Sutherland, R. L. & Simpson-Morgan, M. W. The thyroxine-binding properties of serum proteins. A competitive binding technique employing sephadex G-25. *J. Endocrinol.* **65**, 319–332 (1975).
136. Savu, L. *et al.* A senescence up-regulated protein: the rat thyroxine-binding globulin (TBG). *Biochim. Biophys. Acta* **1097**, 19–22 (1991).
137. Bertilsson, G. *et al.* Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 12208–12213 (1998).
138. Jones, S. A. *et al.* The pregnane X receptor: a promiscuous xenobiotic receptor that has diverged during evolution. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **14**, 27–39 (2000).

139. Lehmann, J. M. *et al.* The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *J. Clin. Invest.* **102**, 1016–1023 (1998).
140. Moore, L. B. *et al.* Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands. *J. Biol. Chem.* **275**, 15122–15127 (2000).
141. Berry, M. N. & Friend, D. S. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells A biochemical and fine structural study. *J. Cell Biol.* **43**, 506–520 (1969).
142. Lacroix, M. Z., Puel, S., Toutain, P. L. & Viguié, C. Quantification of fipronil and its metabolite fipronil sulfone in rat plasma over a wide range of concentrations by LC/UV/MS. *J. Chromatogr. B* **878**, 1934–1938 (2010).
143. Lin, K., Haver, D., Oki, L. & Gan, J. Transformation and sorption of fipronil in urban stream sediments. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 8594–8600 (2008).
144. Lin, K., Haver, D., Oki, L. & Gan, J. Persistence and sorption of fipronil degradates in urban stream sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* **28**, 1462–1468 (2009).
145. Martinkova, M., Kubickova, B. & Stiborova, M. Effects of cytochrome P450 inhibitors on peroxidase activity. *Neuro Endocrinol. Lett.* **33 Suppl 3**, 33–40 (2012).
146. Ioannides, C. *Cytochromes P450 Metabolic and toxicological aspects.* (1996).
147. Tchapanian, E. H., Houghton, J. S., Uyeda, C., Grillo, M. P. & Jin, L. Effect of culture time on the basal expression levels of drug transporters in sandwich-cultured primary rat hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.* **39**, 2387–2394 (2011).
148. Soroka, C. J., Lee, J. M., Azzaroli, F. & Boyer, J. L. Cellular localization and up-regulation of multidrug resistance-associated protein 3 in hepatocytes and cholangiocytes during obstructive cholestasis in rat liver. *Hepatol. Baltim. Md* **33**, 783–791 (2001).
149. Viollon-Abadie, C., Bigot-Lasserre, D., Nicod, L., Carmichael, N. & Richert, L. Effects of model inducers on thyroxine UDP-glucuronosyl-transferase activity *in vitro* in rat and mouse hepatocyte cultures. *Toxicol. In Vitro* **14**, 505–512 (2000).

150. Schaefer, O. *et al.* Absolute quantification and differential expression of drug transporters, cytochrome P450 enzymes, and UDP-glucuronosyltransferases in cultured primary human hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.* **40**, 93–103 (2012).
151. LeCluyse, E. L. Human hepatocyte culture systems for the in vitro evaluation of cytochrome P450 expression and regulation. *Eur. J. Pharm. Sci.* **13**, 343–368 (2001).
152. Leghait, J. *et al.* Fipronil-induced disruption of thyroid function in rats is mediated by increased total and free thyroxine clearances concomitantly to increased activity of hepatic enzymes. *Toxicology* **255**, 38–44 (2009).

Vu, le Président du jury,

Alain PINEAU

Vu, le Directeur de thèse,

Elise VERRON

Vu, le Directeur de l'UFR,

Nom – Prénoms : GUIGNARD Davy, Steve, François, Jean-Yves

Titre de la thèse : Evaluation toxicologique des propriétés perturbatrices thyroïdiennes de contaminants environnementaux

Résumé de la thèse : Les perturbateurs endocriniens sont au cœur des problématiques actuelles de santé publique. Bien que certains effets des PE soient avérés chez l'animal, leur évaluation toxicologique chez l'Homme reste controversée en raison notamment de leurs propriétés particulières (effet à faibles doses, relation dose-effet non-monotone, fenêtres d'exposition critiques...). Pourtant, plusieurs études suggèrent que l'exposition périnatale aux perturbateurs endocriniens induirait des troubles cognitifs. Les perturbateurs thyroïdiens sont particulièrement incriminés puisque les hormones thyroïdiennes contrôlent directement le développement du système nerveux central. Différents modèles d'étude (*in vitro*, larves de xénopes, mammifères) permettent d'identifier les composés perturbateurs thyroïdiens et d'explorer leurs effets biologiques. Ce manuscrit présente une étude des propriétés perturbatrices thyroïdiennes du fipronil sur un modèle cellulaire. Des cultures primaires d'hépatocytes de rat, de mouton et d'Homme ont été exposées au fipronil ou à son principal métabolite, le fipronil sulfone. Sur les hépatocytes de rat, la clairance de la thyroxine a été augmentée par le fipronil et le fipronil sulfone. Une analyse PK/PD a révélé une efficacité similaire des 2 composés mais une puissance au moins 5 fois plus élevée du fipronil sulfone. Chez le rat, le fipronil est fortement métabolisé en fipronil sulfone. En revanche, la métabolisation est beaucoup plus faible chez l'Homme et le mouton, rendant a priori ces 2 espèces moins vulnérables aux effets perturbateurs thyroïdiens du fipronil.

MOTS CLÉS : PERTURBATEUR ENDOCRINIEN, PERTURBATEUR THYROIDIEN, EVALUATION TOXICOLOGIQUE, FIPRONIL, MODELE CELLULAIRE

JURY

PRÉSIDENT : M. Alain PINEAU, Professeur de Toxicologie
Faculté de Pharmacie de Nantes

ASSESEURS : Mme Elise VERRON, Maître de Conférences de Toxicologie
Faculté de Pharmacie de Nantes

Mme Catherine VIGUIE, Directeur de Recherche INRA
UMR 1331 Toxalim INRA/ENVT - TOULOUSE

Adresse de l'auteur : M. GUIGNARD Davy

L'Anglais

85430 LA BOISSIERE DES LANDES