



## **Fipronil et retardateurs de flamme polybromés : exposition et alteration des fonctions thyroïdienne et corticosurrénalienne.**

## **Fipronil and polybrominated flame retardants: exposure and alterations of the thyroid and corticotropic functions.**

Programme National de Recherche "Perturbateurs Endocriniens" \_SRP  
Rapport final

Coordonnées du laboratoire  
Catherine Viguié  
Chargée de Recherches  
UMR 181 INRA ENVT  
31076 Toulouse cedex 3  
tél: 05 61 19 39 13  
E-mail: c.viguie@envt.fr

Date : .28/01/2010.

N° de contrat : 000042

Date du contrat : 22../12./2006..

## Résumé

L'ensemble du travail réalisé sur le fipronil suggère et ce, quelques soient l'approche et le modèle, que le principal mode d'action du fipronil sur la fonction thyroïdienne passerait par une stimulation du métabolisme hépatique des hormones thyroïdiennes. Ceci est particulièrement clair chez le rat mais a également pu être montré chez le mouton grâce à une approche sensible de mesure de la clairance de la T4 libre. Dans cette dernière espèce, les effets du fipronil sont beaucoup moins marqués et ne se traduisent pas par des altérations des profils hormonaux. Cette différence d'espèce est à rapprocher des différences observées en termes d'induction des enzymes hépatiques mais également par rapport aux différences interspécifiques de métabolisme et de l'implication possible de récepteurs nucléaires aux xénobiotiques dans les mécanismes de perturbation thyroïdienne. Des travaux originaux sur lignées neuronales laissent penser que le fipronil pourrait agir au niveau du système nerveux central par des mécanismes de stimulation de l'apoptose résultant de perturbations du métabolisme énergétique de la cellule. Toutefois, d'autres travaux sont nécessaires pour confirmer ces études à des doses en relation avec l'exposition réelle des populations humaines telles que celles décrites dans ce travail, en ciblant des populations neuronales plus particulièrement impliquées dans le contrôle neuroendocrinien de la fonction thyroïdienne et en poursuivant le travail amorcé en terme d'absorption et de transport du fipronil et de ses métabolites. Le rôle du transporteur BCRP, dont l'action est inhibé par le fipronil et son métabolite sulfone à faible dose pourrait notamment être évalué plus précisément. Enfin il est à noter que ce travail souligne l'importance du formidable potentiel de compensation de la thyroïde face à un agent perturbant le métabolisme de ses hormones.

Quant au PBDE, nos résultats suggèrent que le composé decabromé se métabolise très faiblement in vivo et sur cultures d'hépatocytes. Il n'aurait pas, du moins à court terme, d'effets importants sur la fonction thyroïdienne dans un modèle ovin. Le modèle ovin a permis en outre de tester l'hypothèse d'une interaction possible avec la principale protéine de transport des hormones thyroïdiennes chez l'homme et le mouton. Nos résultats suggèrent que les dérivés faiblement bromés pourraient interagir avec cette protéine induisant des modifications subtiles du comportement pharmacocinétiques de la forme libre des hormones

## SOMMAIRE

<b>I - PARTIE 1 : RESULTATS FIPRONIL.....</b>	<b>4</b>
I-1. EVALUATION DE L'EXPOSITION .....	4
I-1.1. <i>Evaluation comparative des paramètres pharmacocinétiques (PK) de l'exposition dans différents modèles animaux</i> 4	
I-1.2. <i>Evaluation quantitative et qualitative de l'exposition au fipronil chez l'homme</i> .....	5
I-1.3. <i>Evaluation d'une source alimentaire potentielle de contamination de l'homme par le fipronil : produits de l'apiculture</i> .....	6
I-2. MECANISMES DE L'EXPOSITION: PASSAGE DE LA BARRIERE DIGESTIVE, TRANSPORT ET PENETRATION CELLULAIRE.....	8
I-2.1. <i>Caractérisation du passage de la barrière digestive sur des lignées cellulaires humaines</i> .....	8
I-2.2. <i>Interaction du fipronil et de son principal métabolite le fipronil sulfone avec des transporteurs pompes à efflux</i> .....	9
I-3. MECANISMES DE L'EXPOSITION : DEVENIR METABOLIQUE .....	10
I-3.1. <i>Evaluation qualitative de l'exposition dans des modèles animaux lors de contamination par voie orale</i> .....	11
I-3.2. <i>Etudes métaboliques in vivo</i> .....	11
I-3.3. <i>Etudes métaboliques in vitro</i> .....	12
I-3.4. <i>Métabolisme hépatique</i> .....	13
I-4. MARQUEURS D'EXPOSITION/ MARQUEURS D'EFFETS APPROCHE TRANSCRIPTOMIQUE .....	14
I-5. EFFETS PHYSIOPATHOLOGIQUES SUR LES SYSTEMES ENDOCRINIENS D'INTERET.....	17
I-5.1. <i>Approche descriptive : caractérisation des effets sur les axes thyroïdiens et corticotrope in vivo</i> .....	17
I-5.2. <i>Approche mécanistique : détermination du niveau d'interaction avec les axes hypothalamo-hypophyso thyroïdien ou corticossurrénalien</i> .....	19
<b>II - PARTIE 2 : PBDE .....</b>	<b>22</b>
II-1. FACTEURS MODULANT L'EXPOSITION .....	22
II-1.1. <i>Transport cellulaire et plasmatique (UR 66 A Lespine)</i> .....	22
II-1.2. <i>Transport plasmatique du DBDE</i> .....	22
II-1.3. <i>Voie métaboliques et profils d'exposition tissulaire (D Zalko)</i> .....	23
II-2. MECANISMES PHYSIOPATHOLOGIQUES DE PERTURBATION ENDOCRINIENNE .....	24
<b>III - PARTIE 3 : VALORISATION.....</b>	<b>25</b>
III-1. COMMUNICATION ENCONGRES .....	25
III-2. ARTICLES DE RECHERCHES .....	26
<b>V - REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>27</b>

## Préambule

Le programme de recherche que nous avons proposé dans le cadre du PNRPE est un projet multidisciplinaire impliquant plusieurs organismes de recherche. Il s'inscrit dans une logique de collaboration étroite entre les différentes équipes impliquées. Les liens initiés entre les différentes équipes lors de la constitution de ce programme se sont intensifiés au fur et à mesure de sa réalisation soulignant l'aspect fédérateur de ce programme. En outre, le réseau d'équipes initialement impliquées. En effet, le cercle des participants comprend maintenant une équipe de praticiens hospitaliers (Service d'Endocrinologie du Pr Caron, CHU de Toulouse Rangueil), un laboratoire de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes internationalement reconnu en matière de dosage de résidus (le LABERCA) et un laboratoire hospitalier de Toxicologie (CHU de Limoges).

Les 5 axes de recherche développés visent à couvrir l'ensemble des aspects pharmacocinétiques (exposition de l'organisme et disposition des toxiques) et pharmacodynamiques (effets et mécanismes d'action) de deux perturbateurs endocriniens potentiels: le fipronil un insecticide d'usage agrovétérinaire important et les retardateurs de flammes polybromés, des composants majeurs de l'industrie du plastique. Les effets perturbateurs étudiés concernent deux fonctions critiques pour le développement et l'homéostasie du système nerveux central: les fonctions thyroïdienne et corticosurrénalienne. L'objectif à terme était de produire les bases scientifiques permettant une meilleure évaluation des effets toxiques de ces deux composés et ainsi de contribuer à l'analyse du risque qu'ils constituent pour la santé humaine en tant que perturbateurs endocriniens. En ce sens, ce projet a apporté un certains nombres de connaissances qui peuvent être réutilisées dans un cadre opérationnel en relation notamment avec les schémas d'évaluation de toxicologie endocrinienne.

Les équipes ont du faire face à diverses difficultés méthodologiques qui ont justifié certains redéploiements thématiques et dans le cas de l'équipe AFSSA, l'arrêt prématuré des études (tableau 1). En ce qui concerne plus particulièrement la fonction corticotrope, aucune des études réalisées *in vivo* chez le mouton n'ayant permis de montrer de perturbation des niveaux de glucocorticoïdes circulants (cortisol plasmatique), nous avons jugé plus pertinent pour la faisabilité du projet d'abandonner l'investigation de cet axe.

## I - PARTIE 1 : Résultats Fipronil

### I-1. Evaluation de l'exposition

#### I-1.1. Evaluation comparative des paramètres pharmacocinétiques (PK) de l'exposition dans différents modèles animaux

La toxicologie expérimentale fait appel à des modèles animaux différents. Compte tenu de l'existence de très larges variations interspécifiques dans le métabolisme et la disposition des xénobiotiques, des expositions externes (dose et voie d'administration) similaires peuvent conduire à des expositions internes (concentrations plasmatiques et tissulaires) très différentes en fonction de l'espèce. La validité des bilans toxicologiques basés sur la confrontation de résultats obtenus dans différentes espèces animales est donc tributaire d'une bonne estimation de l'équivalence de ces différents modèles pour la pharmacocinétique des substances étudiées (toxicocinétique).

Equipe	Objectifs	Objectif atteint	Valorisation	Cause abandon et réorientation
UMR 181 INRA/ENVT Toulouse	1)Pharmacocinétique comparative du fipronil chez le rat et le mouton 2)Pharmacocinétique comparative du DBDE	+ -	Leghait et l. Tox Letters	Phase animale faite problème analytique pour les PBDE
Service des Maladies Professionnelles et Environnementales Hôpital Purpan Toulouse	1)Recrutement des cohortes collectes d'échantillons 2)Dosage des échantillons 3)Analyse des données	+ + +	3 communications en congrès 1 publication en cours de rédaction	Seule la contamination en milieu professionnel a été faite
Unité de Pathologie de l'Abeille. AFSSA Sophia Antipolis	1)Récoltes d'échantillons et analyses 3)Récolte échantillons- Traitement des données	+ -	Aucune	Premier échantillonnage non conclusif du fait de l'interdiction du fipronil en France
UMR 406 INRA Avignon	1)Passage à travers les Caco 2 en monocouche – 3)Cytotoxicité sur Caco2	+ +	Vidau et al. Tox in vitro	
UR 66 INRA Toulouse	1)Inhibition compétitive des ABC transporteurs 2)Transports par transporteurs et protéines plasmiques 3)Modèle sacs intestinaux éversés	+ + -	Expérimentations complémentaires pour préciser le rôle des BCRP en vue de publication	Résultats PgP et MRP ne justifiaient pas un passage sur modèle de sacs éversés Les résultats BCRP n'ont été obtenus qu'en 2009
UMR 1089 INRA/INPT/ENVT Toulouse	1)Acquisition, Synthèse des molécules marquées et standards 2) Métabolisme du DBDE <i>in vivo</i> (rat) 3)Identification métabolites 4)Métabolisme du fipronil et du DBDE <i>in vitro</i> 5)Profils métaboliques <i>in vitro</i> 6)Développement d'une méthode d'analyse du DBDE et ses métabolites 7)Dosage des échantillons des études PK 8)Analyse Rédaction des résultats	+ + + + + +	Riu et al., Environment International	
UMR 1112 INRA/UNSA Sophia Antipolis	1)Cytotoxicité/ apoptose sur hépatocytes humains 2)Métabolismes hépatique- 3)Potentiel inducteur sur hépatocytes 4) Collecte échantillons ARN pour approches transcriptomique 5)Hybridation et analyse des puces ADN	+ + + + +	Publications en cours de préparation	
UMR 181	Altération des profils endocriniens par le fipronil et PBDE chez le mouton : 1)Exposition aiguë 2)Exposition chronique	+	Leghait et al. Toxicology Letters	Fait pour fipronil et PBDE en subchronique (14j à 3 mois expo)
UMR 181	1) Exploration périphérique et hypophysaire exposition aiguë 2) Exploration système nerveux central : administration chronique	+ Fipronil + Fipronil	Leghait et al. Toxicology Letters	PBDE non fait du fait des difficultés méthodologiques à caractériser l'exposition interne
UMR 406	Modulation des effets de la THR et des hormones thyroïdiennes sur les lignées cellulaire GH	-	1 publication en préparation	Culture impossible des lignées GH. Evaluation d'effets centraux sur lignées neuronales

**Tab. 1:** Récapitulatif de réalisation des différents objectifs du projet et des valorisations associées

Dans cette partie du projet, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la comparaison entre deux espèces: le rat en tant qu'espèce de référence pour les évaluations toxicologiques réglementaires et seule espèce pour laquelle on disposait de données concernant l'effet du fipronil sur la fonction thyroïdienne et l'ovin, modèle développée dans le cadre de ce projet comme plus pertinent par rapport à l'homme en terme de régulation de la fonction thyroïdienne.

Le rapport fipronil sulfone/ fipronil était plus élevé chez le rat que chez le mouton. Les concentrations en fipronil sont demeurées plus faibles chez le rat et étaient même non quantifiables après le deuxième jour de traitement (Fig.1). Chez le mouton, la persistance de niveaux élevés de fipronil a permis un ajustement des données avec un modèle pharmacocinétique et l'estimation de la demi-vie du fipronil ( $73 \pm 10$  heures). Une augmentation importante de la vitesse d'élimination du fipronil entre la première et la dernière administration a été notée chez le rat mais pas chez le mouton (Fig.1). **Le fipronil induirait donc des enzymes hépatiques impliquées dans son propre métabolisme chez le rat mais pas chez le mouton.** Conformément à cette hypothèse, un traitement au fipronil a augmenté la clairance de l'antipyrine, paramètre test de l'activité enzymatique hépatique, chez le rat mais pas chez le mouton (Fig.2). Ce travail souligne la nécessité d'intégrer dans les évaluations toxicologiques les particularités d'espèce en termes de toxicocinétique.

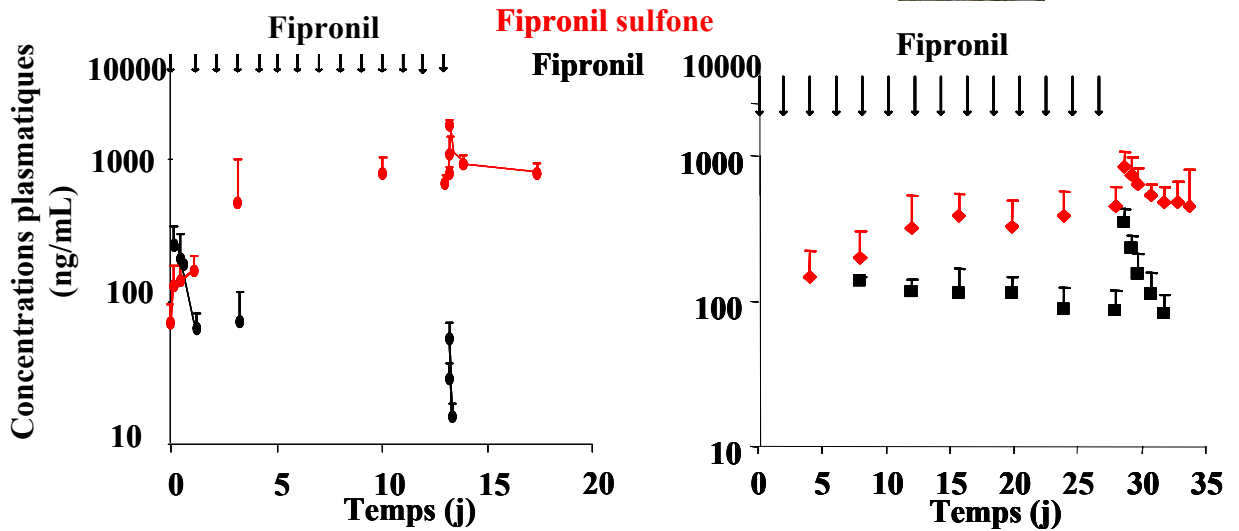
### **I-1.2. Evaluation quantitative et qualitative de l'exposition au fipronil chez l'homme**

Il existe trois sources potentielles d'exposition au fipronil pour l'homme: les produits phytosanitaires (ex : traitement des semences), les biocides (lutte contre les termites et les blattes) et les produits vétérinaires (traitement préventif et curatif des chiens et des chats contre les puces et tiques). Dans un premier temps notre intérêt s'est porté plus particulièrement sur l'usage vétérinaire de ce produit.. Notre objectif était donc d'évaluer qualitativement et quantitativement l'exposition de l'homme au fipronil à usage en milieu professionnel, au moment de la fabrication du produit. Les objectifs spécifiques étaient de 1- disposer de données réelles d'exposition internes observables chez l'homme lors d'exposition chronique et de les mettre en perspectives par rapport aux données d'exposition obtenues dans nos dispositifs expérimentaux, 2- d'évaluer les corrélations entre les concentrations plasmatiques en fipronil et/ou son métabolite sulfone et les paramètres fonctionnels thyroïdiens (TSH, T4 libre et totale) chez des salariés exposés au fipronil.

Une étude prospective, descriptive et transversale de l'imprégnation sérique en fipronil et fipronil sulfone ainsi que des paramètres fonctionnels thyroïdiens (TSH, T4totale, T4libre) a été réalisée sur 159 personnes, d'âge moyen de  $34.1 \pm 7.5$  ans après une exposition professionnelle moyenne de  $4.0 \pm 3.6$  ans (Fig.3).

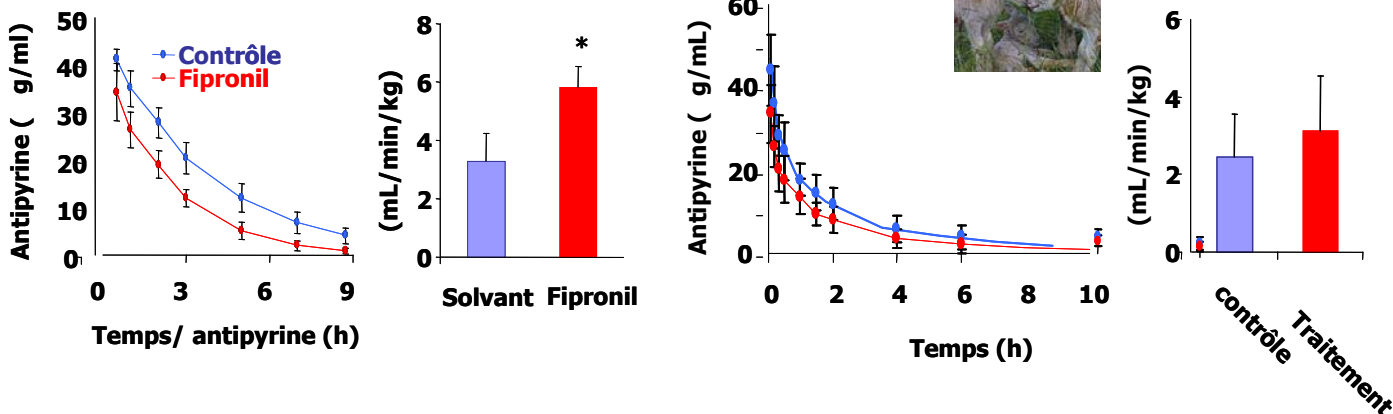
**Des concentrations détectables en fipronil ont pu être mesurées** sur 32 salariés avec un **taux moyen de  $0.47 \pm 0.28$  ng/mL**. Le fipronil sulfone était mesurable chez 155 salariés avec un **taux moyen de  $7.79 \pm 7.65$  ng/mL**. La durée d'exposition professionnelle au fipronil était positivement corrélée aux concentrations sériques de fipronil ( $r : 0,38 - p : 0,03$ ) et de fipronil sulfone ( $r : 0,34 - p < 10^{-4}$ ). Aucune corrélation entre les concentrations de fipronil et de TSH ( $p=0.86$ ), de T4totale ( $p=0.90$ ) ou de fipronil sulfone et de T4totale ( $p=0.37$ ) n'a pu être mise en évidence (Fig. 4 – Tab. 2)

**Cette étude transversale n'a pas mis en évidence de lien entre l'imprégnation sérique en fipronil ou fipronil sulfone et les paramètres fonctionnels thyroïdiens après exposition professionnelle à faible niveau** (environ 50 fois plus faible que l'exposition minimale cumulée pour fipronil et son métabolite dans nos dispositifs expérimentaux ovins et 150 fois plus faibles que dans nos dispositifs rats). En outre, il n'existait aucune surreprésentation de pathologie thyroïdienne dans notre échantillon « exposé » par rapport à la population générale. Finalement, le ratio fipronil/fipronil sulfone était en moyenne de 16 dans cette étude, alors que chez le rat, il peut



**Fig.1** : Evolution des concentrations plasmatiques en fipronil et son principal métabolite fipronil sulfone lors d'administration répétées par voie orale de fipronil chez la ratte (flèches; 3 mg/kg/j ; graphe de gauche et chez la brebis (flèches 5 mg/kg tous les 4 jours). Les deux molécules ont été dosées par HPLC/UV ou LC-MS/MS dans des prélèvements sériés de sang après la première et la dernière administration de fipronil et dans des prélèvements ponctuels réalisés juste avant une nouvelle administration en cours de traitement.

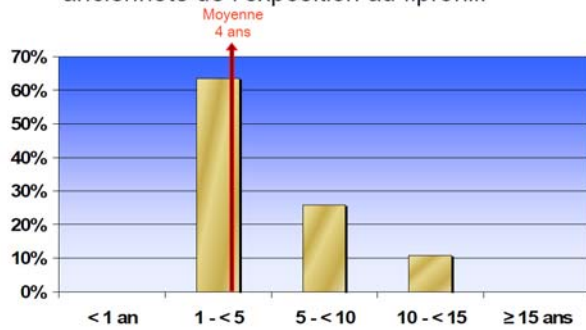
**Effets d'un traitement au fipronil sur l'activité des cytochromes hépatiques *in vivo* (clairance de l'antipyrine)**



**Fig.2**: Effet d'un traitement oral au fipronil sur la clairance de l'antipyrine chez la rate (fipronil 3 mg/kg/j x 14 jours) graphe de gauche et chez la brebis (fipronil 5 mg/kg tous les 4 jours x 28 jours). La clairance de l'antipyrine a été estimée d'après la cinétique de décroissance des concentrations plasmatiques en antipyrine suite à une administration unique (ip rate, iv mouton) d'antipyrine.

- Caractéristiques professionnelles

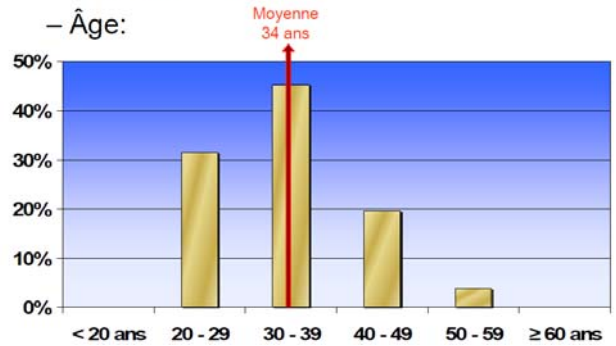
- ancienneté de l'exposition au fipronil:



- Caractéristiques personnelles

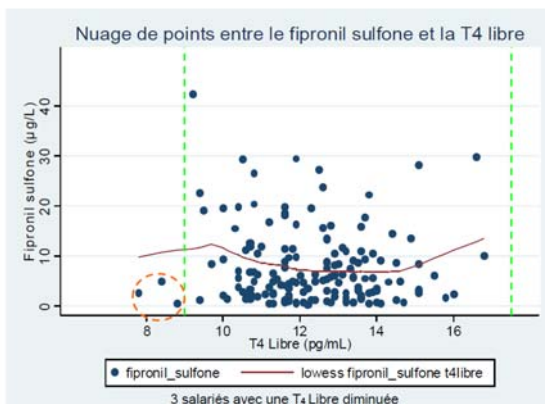
- sexe ratio: 1,01

- Âge:

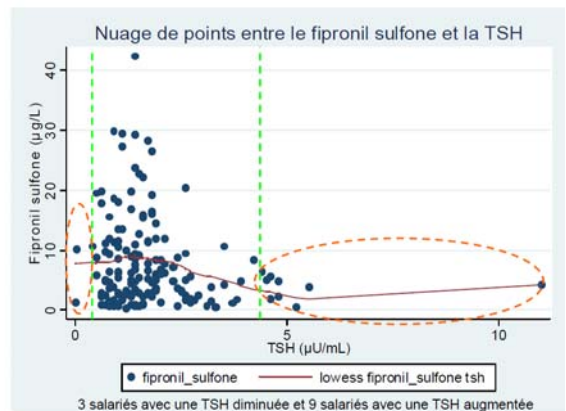


**Fig.3:** Principales caractéristiques de la cohorte de travailleurs “exposés” sur laquelle est basée l’étude

### T4 Libre / Fipronil Sulfone



### TSH / Fipronil sulfone



**Fig.4:** Répartition des valeurs des concentrations plasmatiques en fipronil sulfone en fonction de deux paramètres usuels de la fonction thyroïdienne: concentrations plasmatiques en T4 libre et TSH. Les lignes vertes indiquent les valeurs usuelles de ces paramètres.

	moyenne (± écart-type)	Corrélation fipronil n=32	Corrélation fipronil sulfone n=155	Corrélation ancienneté exposition n=159
<b>TSH</b> (0,4-4,4 µU/mL)	<b>1,8</b> (± 1,3)	<b>- 0,03</b> (p=0,86)	<b>- 0,17</b> (p=0,03)	<b>- 0,02</b> (p=0,77)
<b>T4 libre</b> (8,9-17,6 pg/mL)	<b>12,9</b> (± 8,6)	<b>- 0,20</b> (p=0,27)	<b>0,08</b> (p=0,34)	<b>- 0,01</b> (p=0,86)
<b>T4 totale</b> (4,5-10,9 µg/100mL)	<b>8,1</b> (± 1,8)	<b>- 0,02</b> (p=0,90)	<b>0,05</b> (p=0,57)	<b>-0,07</b> (p=0,37)

**Tableau 2 :** paramètres moyens de la fonction thyroïdienne chez 155 salariés d’une usine de conditionnement du fipronil à usage vétérinaire et corrélation avec les concentrations sanguines mesurées en fipronil et son principal métabolite fipronil sulfone



dépasser 200 et que chez le mouton il ne dépassait jamais 6. **Au bilan, ces résultats suggèreraient donc que quantitativement le schéma d'exposition ovin serait plus proche de celui de l'homme que celui du rat.**

### **I-1.3. Evaluation d'une source alimentaire potentielle de contamination de l'homme par le fipronil : produits de l'apiculture**

#### **- La réalité du problème :**

Dans le cadre d'une enquête de suivi de ruchers sentinelles sur le territoire français réalisée par l'Afssa Sophia Antipolis entre 2003 et 2005, des résidus de fipronil et de ses métabolites ont été recherchés dans les prélèvements de pollen de trappe effectués sur ces ruchers. **Cependant, il est important de garder en mémoire que l'autorisation d'utiliser le fipronil en enrobage de semences a été suspendue à partir de 2004 en France, situation compromettant cette partie du projet qui a commencé en 2007.**

#### **- Échantillonnage :**

Du fait de l'interdiction de l'emploi du fipronil en enrobage de semences en France, nous avons décidé de réaliser des prélèvements de miel et de pollen dans les autres pays européens où cette utilisation est encore pratiquée. Plusieurs pays européens emploient en effet ce produit pour l'enrobage des semences de maïs (Belgique, Italie, Bulgarie, Espagne, Roumanie, Slovaquie) et de tournesol (Bulgarie, Slovaquie, Roumanie, Espagne). Nous avons donc essayé de réaliser un échantillonnage ciblé de pollen et de miel, de préférence sur les cultures susceptibles d'être issues de graines enrobées (tournesol) et dans les pays où cette utilisation est la plus large. Mais il a été difficile de se procurer ces échantillons car nous devions acheter de façon aléatoire des miels et pollens identifiés comme étant d'appellation "tournesol" dans les lieux de vente de différents pays (Italie et Bulgarie principalement) et nous n'avions pas les informations concernant les traitements employés.

#### **- Analyses chimiques :**

Plusieurs étapes sont réalisées dans le cadre d'une préparation d'un échantillon en vue d'un dosage de résidus de pesticides : extraction, purification et dosage à l'aide de techniques chromatographiques. Les seuils de détection que nous nous fixons pour doser le fipronil et ses métabolites étant très faibles, la technique d'analyse telle que la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC/MS/MS) est nécessaire.

La méthode a été mise au point au laboratoire sur le pollen.

Les molécules étudiées sont les suivantes :

- le fipronil,  $C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$  ( $437,5 \text{ g.mol}^{-1}$ )
- les métabolites du fipronil :
  - le fipronil-désulfinyl (MB 46513),  $C_{12}H_4Cl_2F_6N_4$  ( $389,1 \text{ g.mol}^{-1}$ )
  - le fipronil-sulfone (MB46136),  $C_{12}H_4Cl_2F_6N_4O_2S$  ( $453,1 \text{ g.mol}^{-1}$ )
  - le fipronil-sulfide (MB46950),  $C_{12}H_4Cl_2F_6N_4S$  ( $421,1 \text{ g.mol}^{-1}$ )

- 1) Pour la préparation des échantillons de pollen en vue du dosage des résidus de pesticides, des extractions en phase solide (SPE) ont été testées sur le pollen prélevé sur le rucher expérimental du laboratoire. Les cartouches SPE de type florisil (1 g, 6 ml), Strata X (500 mg, 3 ml) et Bakerbond

SPE amino/carbone (500 mg, 6 ml) ont été étudiées. Les cartouches Bakerbond amino/carbone ont été retenues car elles ont permis d'éliminer les interférents (pigments des pollens) et d'obtenir des rendements d'extraction satisfaisants (compris entre 70 et 110%). L'emploi de ces cartouches SPE pour la purification des échantillons permet également de réduire les quantités de solvants utilisés. Pour contrôler l'extraction du fipronil et de ses métabolites dans tous les échantillons, l'ajout d'un étalon interne, le diméthoate-D6, a été réalisé au début du protocole de préparation des échantillons.

Il est à noter que pour l'analyse du fipronil, un protocole de nettoyage spécifique de la verrerie doit être mis en place au laboratoire pour éviter toute contamination (adsorption du fipronil sur le verre). Par conséquent, toute la verrerie utilisée pour la préparation des échantillons est plongée dans un bain d'eau à 1% de RBS 48 S puis rincée à l'eau avant d'être lavée à la machine puis rincée à l'acétone.

2) Le dosage des résidus de fipronil et de ses métabolites est réalisé en LC/MS/MS triple quadripôle.

- Les paramètres chromatographiques sont les suivants :

- Colonne chromatographique : ChromSep Polaris C18-A, 100 mm, d.i : 3 mm, porosité : 3 µm

- **Gradient de phase mobile composée d'un mélange méthanol/eau, débit de 0,5 ml/min, 20µl de volume d'injection.**

- Pour la détection, la spectrométrie de masse est réalisée à l'aide d'une source electrospray (ESI) en mode alterné (positif puis négatif) et pour la quantification, le mode SRM (Selected Reaction Monitoring mode) est employé. Les transitions de masse sont les suivantes :

Les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) sont de 0,05 µg/kg et de 0,1 µg/kg respectivement.

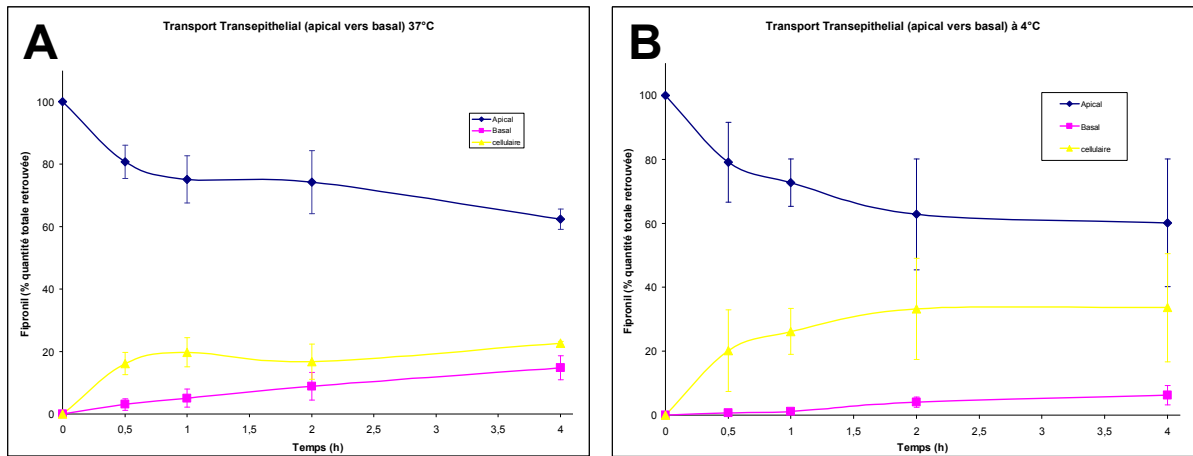
- **Analyses polliniques :**

En complément des analyses de résidus de fiproles (ensemble fipronil et ses métabolites), des analyses polliniques ont été réalisées pour définir les origines florales et géographiques des miels et pollens étudiés. Ces analyses ont été effectuées à l'aide de la microscopie optique. **L'origine florale annoncée comme « tournesol » des prélèvements n'a pas toujours été confirmée par l'analyse pollinique entraînant une incertitude concernant la pertinence des prélèvements obtenus.**

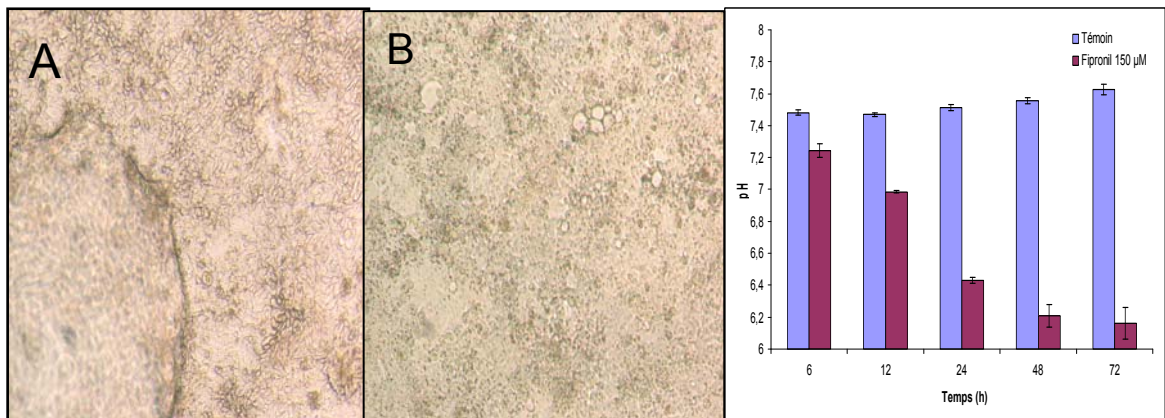
- **Bilan :**

Il est difficile de se procurer des échantillons et de connaître les sites traités au fipronil. Par conséquent, l'échantillonnage a été réalisé de façon aléatoire. Au niveau analytique, des effets matrices ont été rencontrés avec le pollen, ce qui nous a amené à tester plusieurs purifications (SPE) (florisil, Strata-X et amino/carbone). Les cartouches amino/carbone offrant la meilleure réponse ont été retenues. **Le projet s'est arrêté début 2009 car le fipronil n'étant plus utilisé et l'échantillonnage ne pouvant être maîtrisé, le laboratoire n'a pas poursuivi la recherche de résidus de fipronil.**





**Fig. 5 :** Transport transépithélial du fipronil (100 µM) à 37°C (A) et 4°C (B).



**Fig.6:** Effet du fipronil sur la monocouche cellulaire Caco-2 : (A) Cellules Caco-2 témoin et (B) cellules Caco-2 exposées 48 h au fipronil (100 µM). (C) Acidification du milieu de culture suite à une exposition au fipronil (150 µM).

## I-2. Mécanismes de l'exposition: passage de la barrière digestive, transport et pénétration cellulaire

La biodisponibilité des molécules d'intérêt dépend de multiples facteurs liés aux molécules elles-mêmes (propriétés physicochimiques) mais également aux différents mécanismes physiologiques pouvant limiter leur passage intestinal (présence de pompes à efflux de type ABC transporteurs) ou encore à leur arrivée dans la circulation systémique (effet de premier passage hépatique lors de contamination par voie orale). Les objectifs de cette partie était donc de mieux cerner les mécanismes éventuelles de passage des barrières physiologiques comme facteur pouvant conditionner le potentiel toxique des molécules d'intérêt. Cette partie du travail repose sur l'utilisation de modèles cellulaires.

### I-2.1. Caractérisation du passage de la barrière digestive sur des lignées cellulaires humaines

Dans le souci d'évaluer l'impact du Fipronil sur une éventuelle perturbation endocrinienne chez l'homme, nous nous sommes intéressés à la biodisponibilité du fipronil dans l'organisme au travers de son absorption intestinale et de ses effets potentiels sur les cellules intestinales.

Afin de réaliser ces travaux, nous avons utilisé la lignée cellulaire Caco-2 qui présente après différenciation toutes les caractéristiques des cellules épithéliales intestinales {Delie, 1997;Pinto, 1981}. Les cellules Caco-2 sont très largement utilisées *in vitro* pour prédire *in vivo* l'absorption intestinale chez l'homme de xénobiotiques et plus particulièrement des médicaments {Yamashita, 2000;Le Ferrec, 2001}. Cette lignée cellulaire permet également d'étudier les mécanismes d'absorption de divers xénobiotiques {Brunet, 2004}. Le transport transépithélial de cet insecticide a été étudié à travers la monocouche cellulaire étanche formée par les cellules Caco-2. Une fois différenciées, les cellules délimitent deux compartiments distincts et étanches que sont les compartiments apicaux (lumière de l'intestin) et basaux (compartiment sanguin).

Le transport du fipronil au travers de la monocouche est étudié à la température de 37°C ou 4°C à des concentrations finales pharmacologiques allant de 10 à 350 µM (3.5 à 121.5 µg/mL ; Fig. 5).

Les résultats ont permis de déterminer le coefficient de passage apparent (*Papp*) du fipronil à travers la monocouche à l'aide de la formule suivante {Meaney, 1999} Le *Papp* du fipronil est de  $5,35 \cdot 10^{-6}$  cm/s, il nous permet d'évaluer la fraction absorbable *in vivo* chez l'homme qui serait de 100% {Artursson, 2001;Yee, 1997}.

La différence entre les cinétiques de transport observées à 37 et 4°C (Fig.5) laisse penser que le transport transépithélial du fipronil est à la fois passif (simple diffusion) et actif (implication soit de transporteur actif ATP-dépendant et/ou de phénomènes de co-transport). De plus, nous pouvons également affirmer que le transport du Fipronil est vectorisé dans le sens apical vers basal (données non montrées). Ce résultat va dans le sens de la prédiction d'une absorption rapide et complète du fipronil *in vivo* chez l'homme. En outre, dans le laps de temps utilisé pour nos expériences, le fipronil n'était que très faiblement métabolisé (< 1 %). Cependant à la concentration en fipronil de 100 µM (soit 43.7 µg/mL) utilisée, la monocouche cellulaire présentait à 48 h des anomalies morphologiques (Fig. 6A et 6B) et le milieu de culture semblait s'acidifier (modification de la couleur de l'indicateur de pH incorporé au milieu). L'intégrité de la monocouche cellulaire semblant atteinte, la cytotoxicité du fipronil sur les cellules Caco-2 différenciées a donc été étudiée sur 48 h en mesurant le relargage dans le milieu de culture de la lactate-déshydrogénase (LDH) par spectrophotométrie et en déterminant le taux intracellulaire d'ATP par chimioluminescence.

Les résultats obtenus sur les effets du fipronil sur la monocouche montrent que le fipronil présente une toxicité pour les cellules Caco-2 différenciées tout en réduisant le pool d'ATP intracellulaire ce

qui peut entraîner de grave dysfonctionnement cellulaire. De plus, l'augmentation de la consommation de Glucose par les cellules exposées au fipronil (150  $\mu\text{M}$  soit 65  $\mu\text{g/ml}$ ) couplée à une accumulation de lactate ainsi qu'à une augmentation globale de l'activité du métabolisme énergétique mesurée par la métabolisation d'un sel de tétrasolium (MTT) suggèrent que le fipronil agit au niveau mitochondrial en tant qu'agent découplant et crée un stress énergétique.

## **I-2.2. Interaction du fipronil et de son principal métabolite le fipronil sulfone avec des transporteurs pompes à efflux**

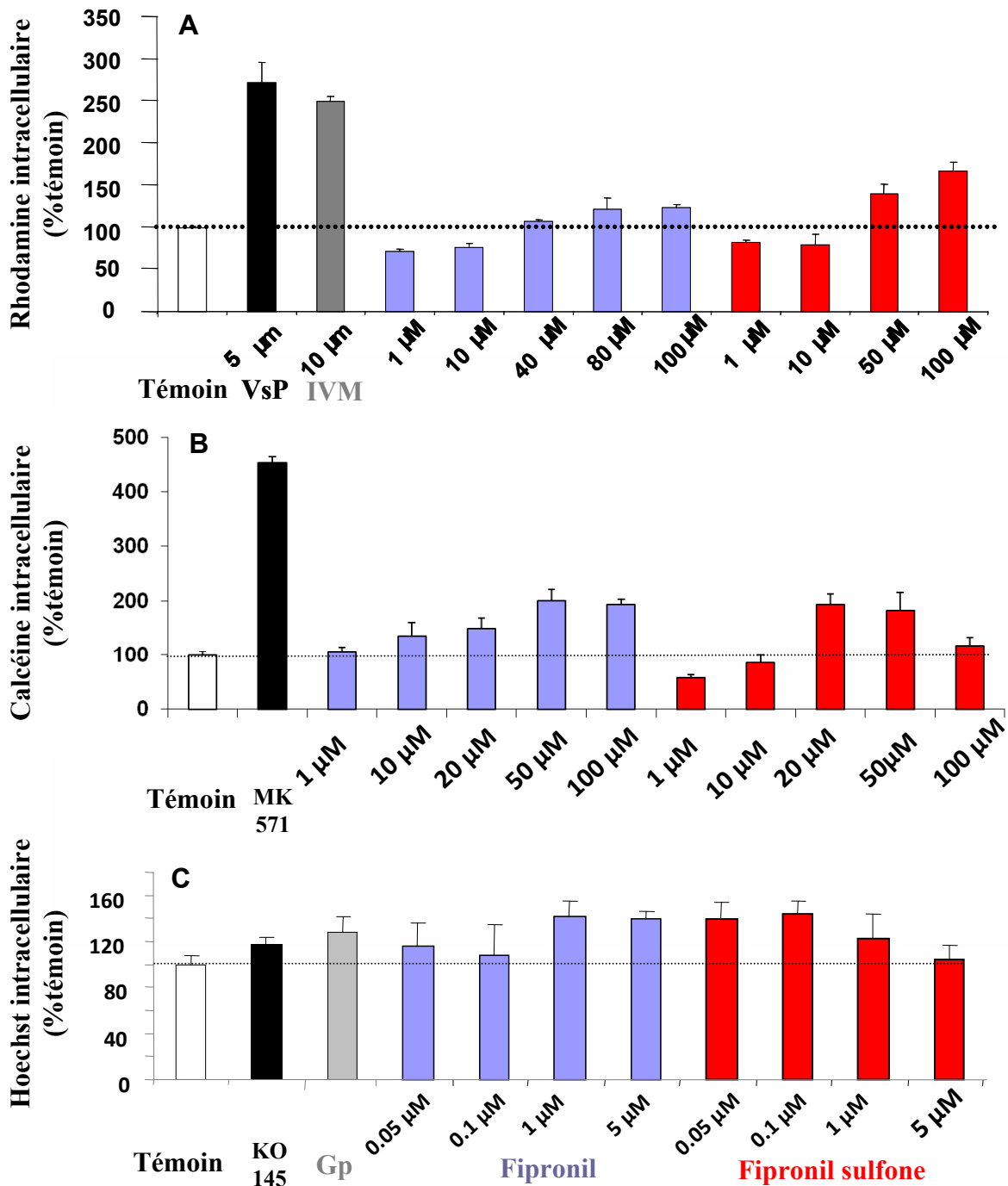
Notre objectif était d'étudier certains acteurs qui conditionnent l'exposition de l'organisme aux xénobiotiques et notamment l'entrée et la distribution tissulaire des composés d'intérêt. Le fipronil et l'un de ses principaux métabolites chez l'homme, le mouton et le rat (cf. I-1) le fipronil sulfone ont été plus particulièrement étudiés. Nous avons évalué l'implication potentielle de protéines membranaires d'efflux actif de la famille des « ATP binding cassette » ou transporteurs ABC, dans l'absorption et la distribution tissulaire du fipronil en déterminant dans un premier temps si ces molécules peuvent moduler l'activité de ces transporteurs. Parmi les différents types de transporteurs ABC, nous nous sommes intéressés à la P-glycoprotéine (Pgp), aux MRP (pour Multidrug Resistance Associated Protéine) et BCRP (Breast Cancer Resistant Protein) parce qu'ils sont plus particulièrement impliqués dans le transport des xénobiotiques. .

### Modulation de la fonction de transport des ABC transporteurs par le fipronil, le fipronil sulfone

Dans le cadre de l'étude des interactions potentielles du fipronil (et ses dérivés) avec la Pgp, MRP et BCRP une première approche a été utilisée pour rechercher le pouvoir inhibiteur de ces composés sur la fonction de transport des ABC transporteurs à l'aide de modèles cellulaires surexprimant les transporteurs d'intérêt, modèles déjà utilisés dans notre équipe.

D'un point de vue méthodologique, le principe de notre approche était de déterminer le pouvoir inhibiteur du composé d'intérêt sur la fonction du transporteur, en mesurant l'accumulation intracellulaire d'un substrat de référence en présence de concentrations croissantes du composé et en le comparant à un inhibiteur de référence. Les concentrations testées ont été choisies sur la base des concentrations circulantes potentiellement retrouvées dans l'organisme et de la toxicité sur le modèle cellulaire déterminée par le test de MTT. On a utilisé (i) pour la P-gp une lignée de cellules épithéliales de rein de porc (LLCPK1) surexprimant la P-gp et on a suivi l'accumulation intracellulaire de la rhodamine123 par spectrofluorométrie, avec ou sans valspodar (Vsp), inhibiteur de référence de la P-gp, ou en présence du composé d'intérêt ; (ii) pour MRP, des cellules A549 issues d'adénocarcinome pulmonaire humain qui surexpriment MRP1, on a suivi l'accumulation de calcéine en présence du MK571, dérivé du leukotriène inhibiteur de MRP ; (iii) pour BCRP, on a suivi le Hoechst comme substrat avec le KO145 (KO) comme inhibiteur de référence de BCRP dans des cellules canines épithéliales de rein (MDCKII) surexprimant BCRP.

Afin de pouvoir comparer l'effet du fipronil et du fipronil sulfone, nous avons représenté nos résultats en pourcentage d'augmentation de la valeur du témoin (substrat seul, ici rhodamine = 100% ; Fig. 7). En présence de l'inhibiteur de la P-gp, le Vsp, une augmentation de 184% de la rhodamine intracellulaire est observée. L'ivermectine à 10  $\mu\text{M}$ , autre inhibiteur puissant de la P-gp, conduit à une augmentation de 177% (Fig. 7A). Le fipronil et le fipronil sulfone ont des effets comparables et conduisent à une inhibition faible de la P-gp correspondant à environ 20 % de l'inhibition obtenue avec le Vsp et ce à partir de 40-50  $\mu\text{M}$  (de l'ordre de  $\sim 20 \mu\text{g/ML}$ ) uniquement



**Fig. 7:** Inhibition de différentes classes de transporteurs ABC (A: PgP – B: MRP – C: BCRP) par le fipronil et le fipronil sulfone sur lignées cellulaires. L'inhibition des transporteurs est évaluée à travers l'accumulation intracellulaire de substrats spécifiques de ces transporteurs lors d'exposition à des concentrations croissantes de toxique (bleu: fipronil; rouge: fipronil sulfone) ou à des quantités de référence d'inhibiteurs reconnus (barres noires et grisées). L'augmentation de l'accumulation intracellulaire des substrats spécifiques est évaluée par rapport aux concentrations intracellulaires de ces substrats en l'absence de tout inhibiteur (100% barres blanches).

qui sont considérées comme concentrations fortes (Fig 7A). Des résultats très similaires sont observés sur les cellules surexprimant MRP1 (Fig. 6B).

En revanche, le fipronil à 1  $\mu\text{M}$  (437 ng/mL, niveaux atteints chez le mouton) et le fipronil sulfone à 0.05  $\mu\text{M}$  (22 ng/mL) inhibent l'activité de transport de BCRP à un niveau comparable à celui du KO145, l'inhibiteur de référence et du GF qui est inhibiteur de BCRP et de Pgp. Il est intéressant de noter que le fipronil sulfone a un effet inhibiteur de l'activité de transport de BCRP à des concentrations faibles (0.05 et 0.1  $\mu\text{M}$ ) et que l'effet est supérieur à celui du KO145 (Fig 7C). La disparition de cet effet à 5  $\mu\text{M}$  ou plus pourrait être imputable à un effet cytotoxique. En outre, lorsque la même expérimentation est conduite sur les cellules parentales non transfectées avec BCRP, les effets du fipronil et du fipronil sulfone ne sont plus observés, ce qui démontre que BCRP est bien la cible de ces composés (résultats non montrés).

**Conclusion :** Ces résultats démontrent que le fipronil et le fipronil sulfone ont un faible pouvoir inhibiteur de la Pgp murine et de MRP1 humain, dans les modèles utilisés ici. **En revanche, ces deux composés inhibent fortement et à basse concentration, de l'ordre des concentrations les plus hautes observées chez l'homme dans cette étude, la BCRP humaine.** Compte tenu du rôle important de BCRP dans l'efflux des xénobiotiques au niveau de l'intestin, de la glande mammaire en période de lactation et des barrières hématoencéphaliques, ces résultats nous encouragent à rechercher les interactions fines du fipronil et du fipronil sulfone avec BCRP notamment par rapport à un potentiel effet neurotoxique (cf. I-5-2). Les prochaines étapes de ce travail seront de rechercher si ces composés sont transportés par BCRP, s'ils sont excrétés dans le lait via BCRP. **Ces transporteurs pourraient participer au mécanisme de transport actif mis en évidence sur cellules caco2 polarisées (I-2-1)** En outre, si les résultats obtenus par l'équipe d'Avignon (I-5-2) en matière de neurotoxicité sont reproduits à des faibles concentrations, **il serait critique d'étudier un éventuel rôle protecteur de ce type de transporteurs par rapport à une exposition du système nerveux central.**

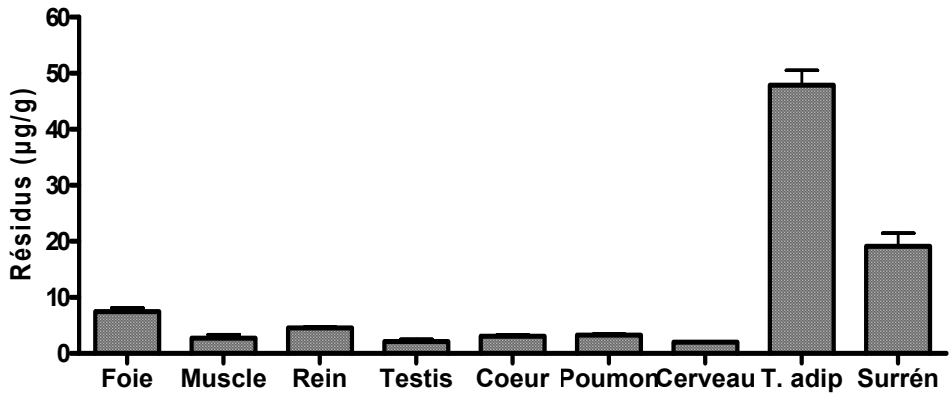
### **I-3. Mécanismes de l'exposition : Devenir métabolique**

Pour les perturbateurs endocriniens comme pour l'ensemble des contaminants chimiques auxquels l'homme est exposé, le métabolisme joue un rôle déterminant dans l'impact et le mode d'action de la substance exogène. La métabolisation est en général un dispositif efficace mis en place par l'organisme pour réduire la présence ou la rémanence d'un composé toxique dans les tissus ou organes cibles. En revanche, pour le fipronil comme pour les PBDE, quelques études indiquent que les métabolites formés ont une activité biologique égale voire supérieure au composé parent {Tingle, 2003; Gill, 2004}. Il est donc nécessaire, en matière d'exposition ou de caractérisation du danger, que ces métabolites soient pris en compte, c'est-à-dire à la fois identifiés et quantifiés.

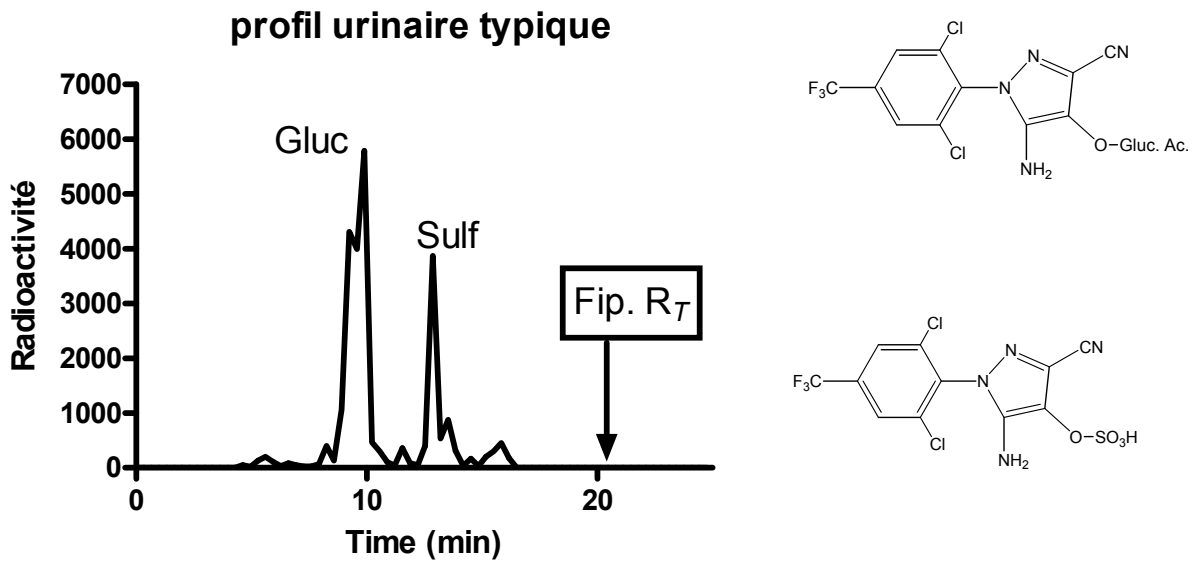
La connaissance des voies et des taux de biotransformation revêt une importance cruciale dans ce projet qui vise à contribuer à l'appréciation du risque chimique pour l'homme sur la base de modèles biologiques différents, tant *in vivo* qu'*in vitro*. Il est donc prévu d'aborder ces études métaboliques sur plusieurs des modèles mis en œuvre dans le projet. En effet, la littérature dans ce domaine est très fragmentaire. Les études publiées sur le métabolisme du Fipronil sont rares, l'essentiel des données est rappelée dans une revue récente {Tingle, 2003} qui montre la bioactivation du fipronil en sulfone correspondant. Le devenir chez l'homme ou encore la nature des résidus dans les tissus cibles qui nous intéressent (thyroïde, surrénales) ne sont pas décrits, alors que les concentrations résiduelles y sont relativement élevées.







**Fig. 8 :** Résidus tissulaires 72 h après une administration unique par gavage de 10 mg <sup>14</sup>C-Fipronil/ kg pc. Les résultats sont exprimés en µg équivalent fipronil/g de poids frais de tissu.



**Fig. 9 :** Radio-chromatogramme urinaire obtenu sur des urines recueillies 24-48h après administration par gavage d'une dose unique de 10 mg <sup>14</sup>C-Fipronil/ kg pc

### I-3.1. Evaluation qualitative de l'exposition dans des modèles animaux lors de contamination par voie orale

#### Rappel des engagements contractuels :

Les objectifs de cette partie du projet étaient :

- 1) l'obtention des molécules d'étude (DBDE et Fipronil) sous forme radio-marquée et la mise au point des méthodes d'analyse de ces molécules modèles et de leurs métabolites.
- 2) La réalisation d'études métaboliques chez le rat, *in vivo*.
- 3) La réalisation d'études métaboliques *in vitro*, incluant une comparaison rat/homme.

#### Obtention des molécules marquées

Fipronil : Le fipronil marqué a été obtenu par synthèse à façon réalisée par une entreprise extérieure au projet. Cette synthèse a lourdement impacté le budget du projet mais la molécule a pu être mise à disposition de toutes les équipes. L'analyse radio-HPLC du Fipronil a été réalisée avant les premières expérimentations chez l'animal. Les conditions analytiques étaient les suivantes: colonne C18 Kromasil, débit : 1mL/min; phase A = tampon acétate d'ammonium 20 mM, pH3 / acétonitrile (90:10, v/v), phase B = acétate d'ammonium 20 mM, pH3 / acétonitrile (10:90, v/v), délivrées comme suit : 0-5 min : 30% A, 70% B ; 5-20 min : gradient linéaire jusqu'à 100% B ; 20-25 min : 100% B ; 25-30 min : retour à 40% A, 60% B ; 30-50 min : 40% A, 60% B. La pureté du <sup>14</sup>C-Fipronil commercial a été évaluée de l'ordre de 95%.

### I-3.2. Etudes métaboliques *in vivo*

Trois rats mâles Wistar adultes ont été repartis en cages à métabolisme. Chaque animal a reçu par gavage une dose de <sup>14</sup>C-Fipronil reprise dans l'huile de maïs correspondant à 10mg/kg. Les urines et fèces ont été recueillies toutes les 24 heures. Au terme des 72 heures d'expérimentation, les rats ont été abattus et les animaux disséqués afin de prélever une aliquote des principaux tissus et organes. La radioactivité présente dans ces tissus a alors été quantifiée par combustion oxydative à l'aide d'un « oxidizer » suivie d'un comptage en scintillation liquide. La radioactivité éliminée dans les excréta a également fait l'objet d'un comptage en scintillation liquide afin d'être en mesure d'établir le bilan métabolique.

**Chez le rat, le bilan à 72 heures montre que le pourcentage total de radioactivité éliminée est de 4,1 +/- 0,8 % dans l'urine et de 4,2 +/- 2,6 % dans les fèces suggérant une rétention importante des résidus dans l'organisme. La figure 8 récapitule les niveaux de résidus retrouvés dans les tissus sur la base de la radioactivité mesurée. Les concentrations tissulaires les plus élevées ont été observées pour le tissu adipeux, les surrénales et le foie.**

Une analyse chromatographique en radio-HPLC a été réalisée sur les échantillons urinaires (Fig. 9). Cette analyse fait apparaître plusieurs pics dont les deux principaux sont sensibles à l'hydrolyse par l'hélicase. L'analyse de ces deux principaux métabolites en LC-MS/MS en mode electrospray indique qu'il s'agit des conjugués à l'acide glucuronique et au sulfate du fipronil ayant perdu le groupement trifluorométhylsulfanyl. Aucune trace de fipronil inchangé n'a été retrouvée dans l'urine. Au cours du temps, le profil urinaire se complexifie, faisant apparaître plusieurs pics de polarité intermédiaire.

Le profil fécal est plus dense que celui observé sur les urines. Si le fipronil est majoritaire pour les échantillons 0-24h, la sulfone correspondante et plusieurs pics polaires dont le sulfo-conjugué sur la fonction amine sont prépondérants.

Ces résultats montrent que le fipronil est largement absorbé et qu'il est ensuite éliminé très lentement dans les urines et les fèces. Cette lente élimination et l'évolution des profils au cours du temps suggèrent un cycle entéro-hépatique important. Des niveaux élevés de résidus sont retenus dans le tissu adipeux et les surrénales. Nous tentons de déterminer la forme sous laquelle ces résidus sont stockés. Bien que de nombreux métabolites mineurs restent inconnus, nous avons pu identifier les principaux produits de biotransformation présents dans les excréta. **Ils indiquent que plusieurs voies métaboliques de phase I et de phase II sont impliquées et confirment la bioactivation du fipronil par la voie de la forme sulfone de ce composé.**

### I-3.3. Etudes métaboliques *in vitro*

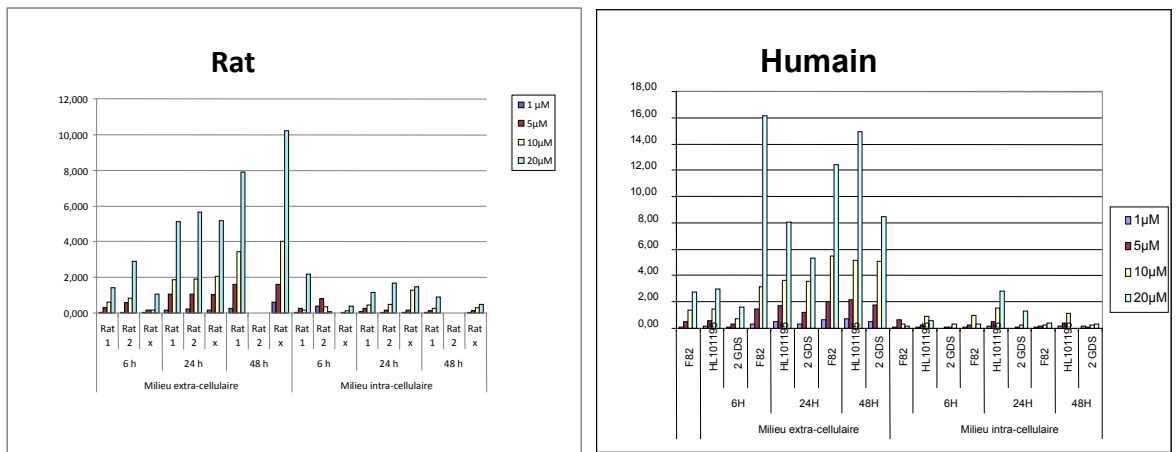
Pour les deux molécules, des études comparatives ont été réalisées chez l'homme et chez le rat, en incubant différentes concentrations des molécules avec des hépatocytes humains ou de rats en culture primaire, en collaboration avec l'équipe de R Rahmani (Sophia Antipolis, partie I-3-4).

Les essais ont été réalisés en incubant du fipronil radio-marqué avec les hépatocytes (homme / rat) en culture primaire sur des durées de 6, 24 et 48 heures, et aux concentrations respectives de 1, 5, 10 et 20  $\mu\text{M}$ . A l'issue de ces incubations, et comme pour le DBDE, les niveaux de radioactivité présents dans les surnageants d'incubation, les cellules elles-mêmes (extraites par un mélange acétonitrile:eau 50:50 v/v) et dans les puits d'incubation (lavage acétonitrile : radioactivité résiduelle) ont été quantifiés. Le bilan de radioactivité était satisfaisant. Les profils radio-HPLC ont été établis, puis les différents pics radioactifs correspondant aux métabolites ont été quantifiés (aire sous courbe). Enfin, les principaux métabolites ont été purifiés en vue de leur analyse structurale par spectrométrie de masse en infusion directe ou en couplage LC-MS.

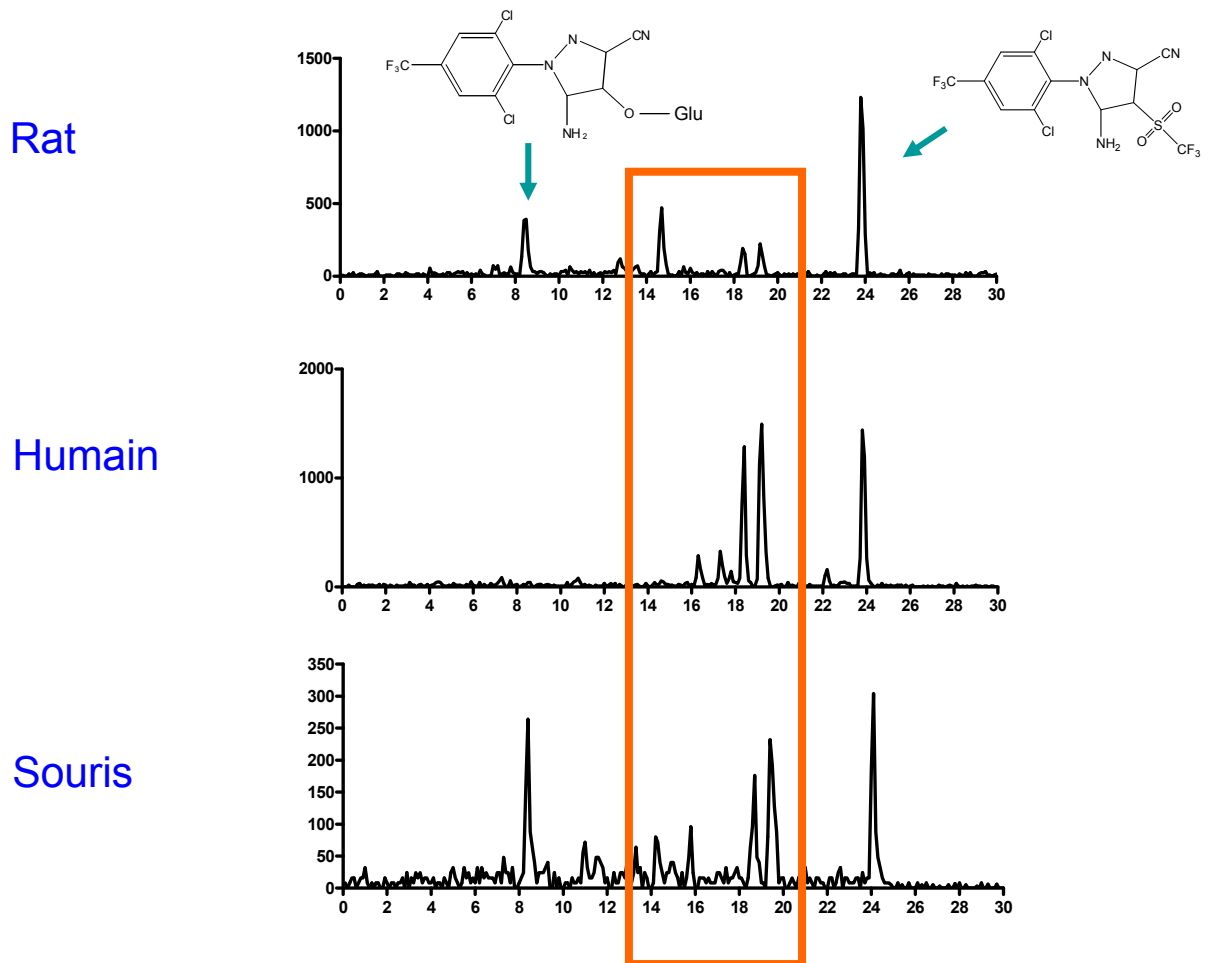
Chez le rat comme chez l'homme, la majorité des métabolites sont localisés dans le milieu extracellulaire (surnageants d'incubation ; Fig. 10).

Du point de vue qualitatif, les profils établis chez le rat et chez l'homme, mais aussi chez la souris, démontrent que le Fipronil a été très largement métabolisé (Fig.11) :

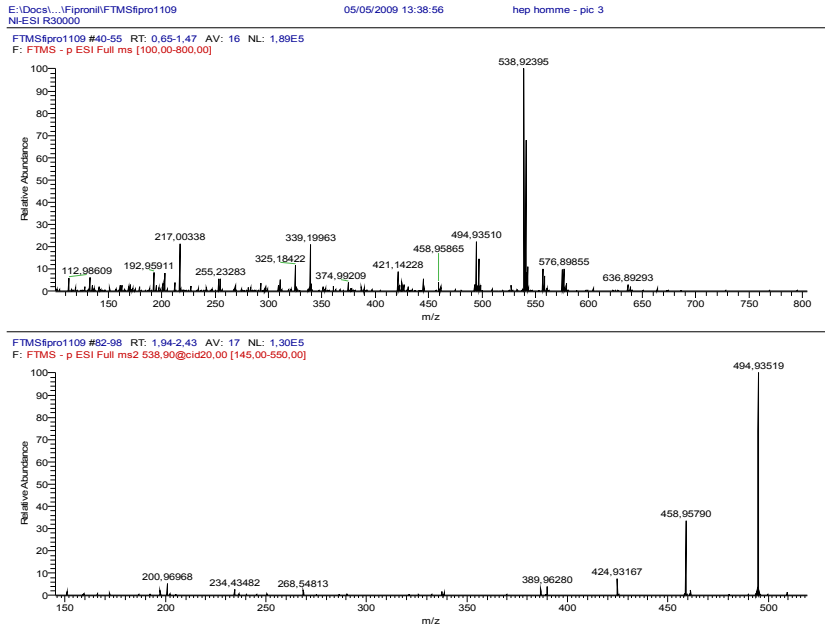
Le métabolite majoritaire, élué à 24 minutes, a été identifié comme étant le fipronil sulfone. Le métabolite le plus « polaire », élué vers 8 minutes, est un glucuronide dérivé de la perte de la chaîne latérale fluorée. Les résultats de l'analyse MS du fipronil sulfone sont présentés, ainsi que sa cinétique de formation chez l'homme (Fig. 12). Pour les métabolites intermédiaires (zone orange encadrée, Fig. 11), les analyses sont encore en cours. Ces métabolites ont été analysés en MS, MS/MS puis en MS haute résolution (HR-MS) pour confirmer les résultats. Nous disposons actuellement de leur formule brute (par exemple, le métabolite élué vers 14 minutes a pour formule  $\text{C}_{15}\text{H}_7\text{O}_3\text{N}_4\text{Cl}_2\text{F}_6\text{S}_2$ ), mais leur structure exacte reste à déchiffrer.



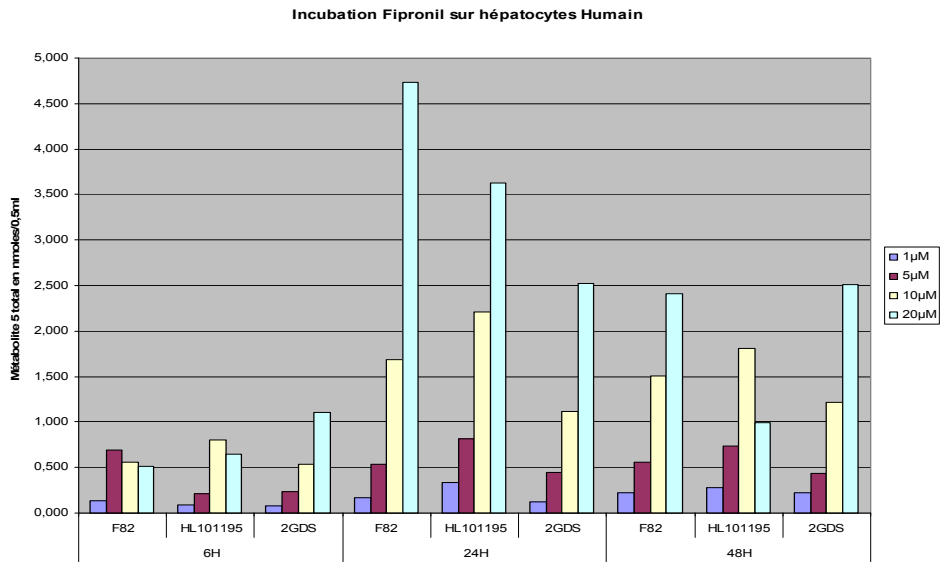
**Fig. 10 :** profils métaboliques du fipronil des milieux de cultures d'hépatocytes de rat et d'hommes en culture primaire.. Les quantités des différents métabolites présents dans le milieu extracellulaire (triplicats) sont représentés pour chaque individu et pour chaque durée d'incubation en nmoles de métabolites totaux/incubation)..



**Fig. 11:** Radio-chromatogrammes comparatifs inter-espèce : établis après incubation d'hépatocytes de rat, homme et souris avec du fipronil marqué au <sup>14</sup>C.

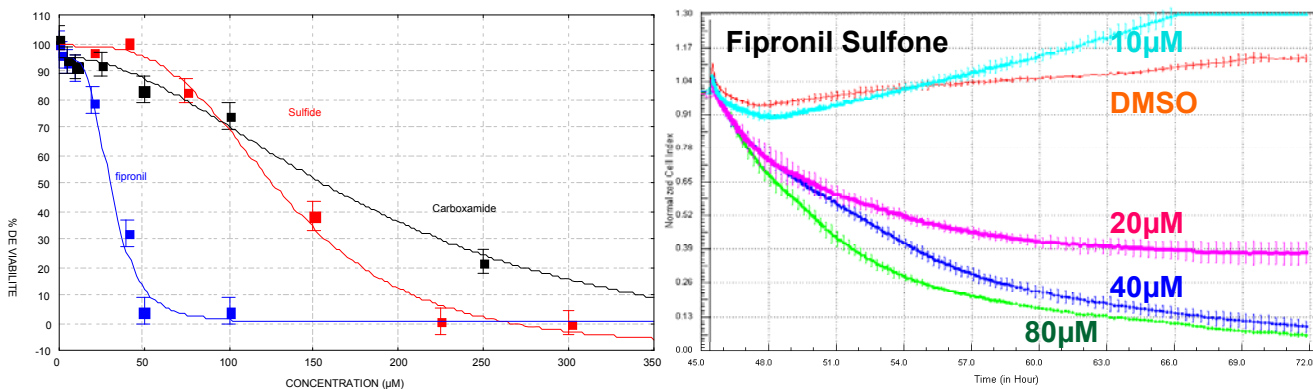
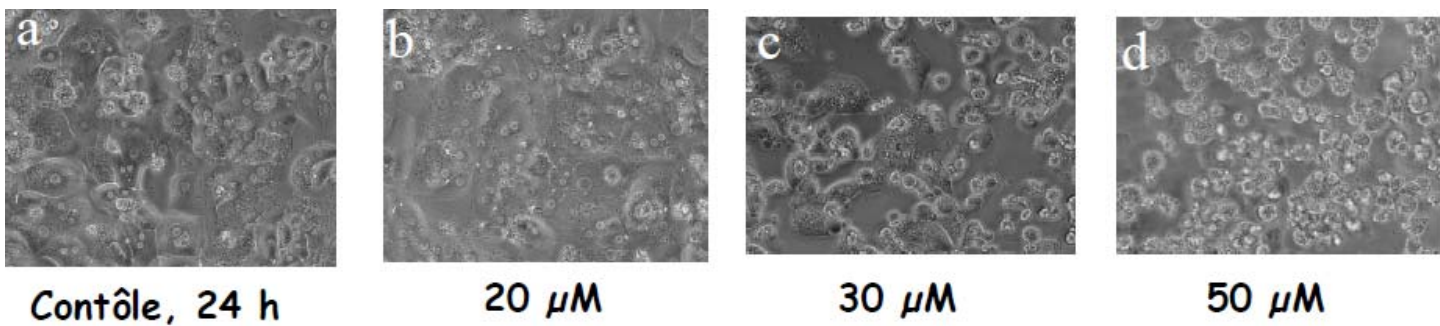


### analyse MS et MS/MS du Fipronil sulfone

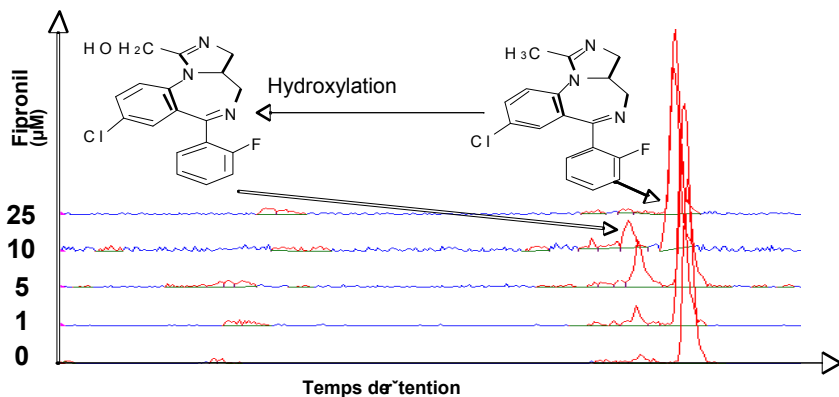
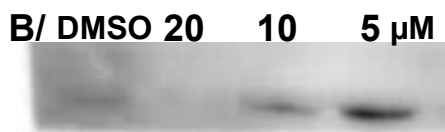
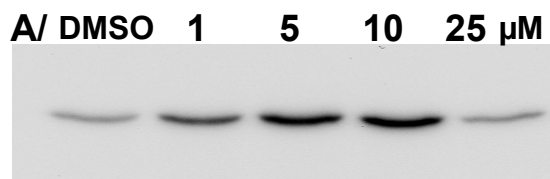


**Fig. 12 :** Analyse et cinétique de formation du fipronil sulfone chez l'homme, en fonction de la durée des incubations et des concentrations utilisées.





**Fig.13:** Effets phénotypiques et cytotoxicité du Fipronil et de ses métabolites majeurs sur hépatocytes primaires



**Fig. 14:** Effets de l'exposition au fipronil (A) et/ou son métabolite, fipronil sulfone (B) sur l'expression des Cytochromes P450 sur culture primaire d'hépatocytes humains: effets sur le contenu en protéines estimé par western blot et sur l'activité d'oxydation du midazolam (graphe de droite)



## I -3.4. Métabolisme hépatique

### Objectifs Généraux

La biotransformation du Fipronil et du DBDE n'est que très incomplètement connue chez l'homme. Il en est de même des impacts cellulaires, moléculaires et génomiques de ces 2 molécules, qui sont très peu étayés chez l'animal et quasi-inconnus chez l'homme. Les travaux avaient pour objectifs de combler ces lacunes en utilisant des primo-cultures d'hépatocytes d'origines humaine et animale (*rongeurs*). Cet outil *in vitro* s'est en effet imposé en toxicologie car il s'agit d'un système dynamique permettant d'intégrer simultanément les processus de transport, de biotransformation et d'effet phénotypique dans la réponse cellulaire globale au stress chimique. Il a largement démontré sa capacité à générer des informations en excellente adéquation avec les données *in vivo*, en termes de profils de biotransformation, de variabilités inter-espèces ou inter-individuelle, d'induction /inhibition enzymatiques, d'hépatotoxicité...

### Objectifs spécifiques

Notre contribution à ce projet consistait:

-d'une part, à analyser le métabolisme hépatique du Fipronil et du DBDE, en étroite collaboration avec l'équipe de D. Zalko.

-d'autre part, à évaluer les impacts phénotypiques et toxicologiques de ces 2 molécules (*et de leurs métabolites disponibles*), et en particulier leur cytotoxicité (*apoptose, nécrose*), leur potentiel inducteur vis-à-vis des Cytochromes P450, ainsi que leur effets sur le transcriptome humain et murin (*en collaboration avec les équipes de X. Gidrol du CEA d'Evry et de T. Pineau - P. Martin*).

### Résumé des résultats

#### **Effets phénotypiques et cytotoxicité du Fipronil et de ses métabolites majeurs**

Dans les conditions normales, après 24h de culture (Fig. 13), les hépatocytes s'agrègent entre eux et s'étalent sur la boîte formant un tapis cellulaire. En revanche, en présence de Fipronil, dès 20  $\mu$ M (8 $\mu$ g/mL) (Fig. 13), les cellules sont très affectées, les travées hépatocytaires sont moins apparentes et les cellules plus individualisées. Un effet dose réponse est observé.

De plus, la mort cellulaire provoquée par le Fipronil peut être caractérisée comme étant de type nécrotique, car aucune activation des caspases 3, 8 et 9 n'est observée. Enfin, l'étude comparative du Fipronil et de ses métabolites indique que les dérivés sulfide et carboxamide sont moins cytotoxique ( $IC_{50}$ ,  $\pm 125$  et  $\pm 150 \mu$ M) que le produit inchangé ( $IC_{50}$ ,  $\pm 30 \mu$ M) alors que le métabolite sulfone ( $IC_{50}$ ,  $\pm 15 \mu$ M), l'est significativement plus.

#### **Effets sur l'expression des Cytochromes P450**

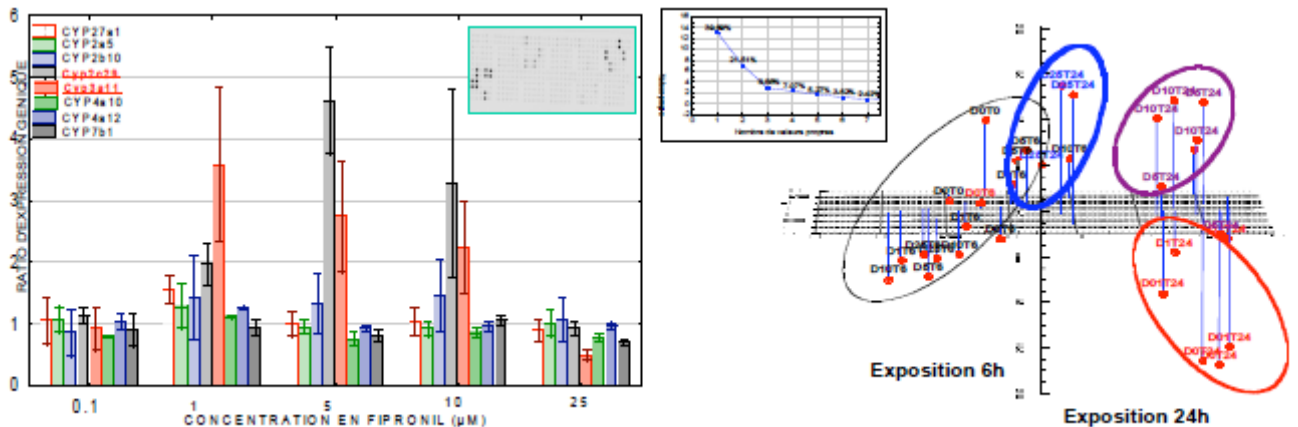
L'exposition d'hépatocytes humains ( $n=4$ ) au Fipronil (A) montre une forte induction de la sous-famille CYP3A4, tant en termes d'expression protéique (Fig.14A *Western Blot*) qu'au niveau de l'activité enzymatique spécifique de cette isoforme (*hydroxylation du Midazolam*). Le dérivé sulfone (Fig.14B) induit aussi significativement cette enzyme. Aucun effet n'est en revanche observé quant aux sous-familles CYP1A1/2.

#### **Effets sur le transcriptome hépatocytaire humain et murin**

L'utilisation de puces à cDNA (5500 gènes humains) montre que le Fipronil induit significativement l'expression de 144 gènes et en réprime 54. Les gènes induits sont impliqués dans les voies signalétiques du métabolisme des acides aminés, l'expression et la traduction protéique (Tab. 3)...

Gene symbol	Fipronil ratio	Description
NFE2L2	8,639	nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
PABPC1	5,378	poly(A) binding protein, cytoplasmic 1
ZNF131	4,913	zinc finger protein 131 (clone pHZ-10)
TCEA1	4,714	transcription elongation factor A (SII), 1
VMP1	4,704	ortholog of rat vacuole membrane protein 1
AASDHPPT	4,566	aminoadipate-semialdehyde dehydrogenase-phosphopantetheinyl transferase
PAI-RBP1	4,421	PAI-1 mRNA-binding protein
SEC24B	4,225	SEC24 related gene family, member B
KIAA1972	4,189	KIAA1972 protein
SYBL1	4,143	synaptobrevin-like 1

**Tab. 3 :** Effet du fipronil sur le transcriptome hépatocytaire humain ( puces à cDNA 5500 gènes humains) . Exemple de gènes induit par une exposition au fipronil d'hépatocytes humains et impliqués dans les voies signalétiques du métabolisme des acides aminés, l'expression et la traduction protéique...



**Fig.15:** Effets génomiques d'une exposition au fipronil sur hépatocytes humains, d'après des résultats obtenus à partir d'une puce dédiée "récepteurs nucléaires de classe II. Le graphe de droite est une représentation en ACP 5 (analyse en composante principale) des résultats obtenus après 6 ou 24 h d'exposition.

De plus, en collaboration avec l'équipe de T. Pineau et P. Martin, l'utilisation d'une puce dédiée «Récepteurs nucléaires de classe II» (*INRA Array 01.2*), confirme l'induction des CYP3a11 et CYP2c29 dans les hépatocytes de souris en réponse au Fipronil (Fig. 15). Plus généralement, l'expression de 33 gènes hépatocytaires est statistiquement affectée et la représentation en ACP indique que la répartition des individus à droite de l'axe Y est liée à la répression de l'expression des gènes L-FABP et Hamp2 et à l'induction des gènes ALDH1, GSTalpha et HSD17b4.

### **Métabolisme du Fipronil**

Plusieurs expérimentations d'exposition de ces molécules à des hépatocytes humains ( $n=3$ ), de rat et de souris ( $n=3$ ) ont été effectuées (*temps d'exposition: 6, 24, 72h; concentrations: 1, 5, 10, 20  $\mu M$* ). En ce qui concerne le Fipronil, nos 1<sup>ières</sup> études qualitatives ont montré la formation du métabolite sulfone chez ces 3 espèces, le dérivé carboxamide n'apparaissant que chez le rat et l'homme, les dérivés sulfide et désulfinyl n'étant pas formés. Les contenus intracellulaires et les surnageants de culture ont été transmis pour analyses radio-HPLC, MS et MS/MS quantitatives par le groupe de D. Zalko.

### **Conclusion**

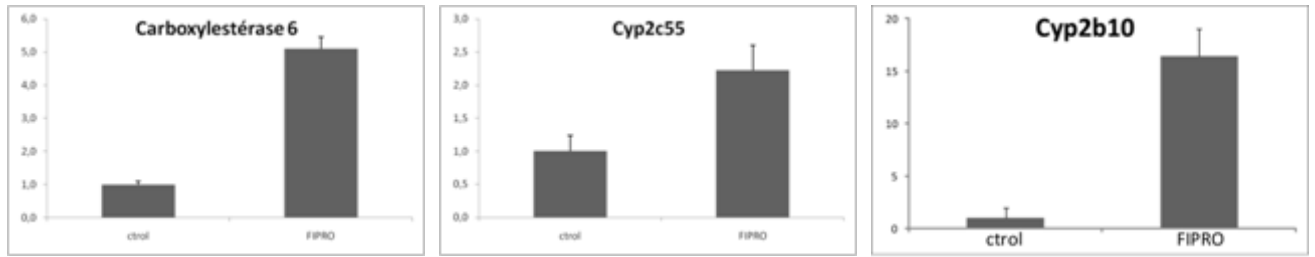
Ces travaux démontrent que le Fipronil exerce un effet cytotoxique de type nécrotique au niveau des hépatocytes humains et murins. Les métabolites sulfide et carboximide montrent des effets bien moindres, contrairement au dérivé sulfone, plus toxique que le produit inchangé. Le Fipronil et le dérivé sulfone induisent en outre fortement les CYP3A4 chez l'homme. Chez la souris, les CYP3a11 et 2C29 sont également induits, ainsi que d'autres gènes intervenant dans la signalisation cellulaire, la traduction protéique... Enfin, les études interspèces de biotransformation menées *in vitro*, soulignent la formation du métabolite sulfone en quantité significative, la présence d'autres métabolites (*notamment conjugués*) étant en cours de caractérisation. Ces recherches ont au total permis une meilleure compréhension du devenir et des activités pharmaco-toxicologiques du Fipronil chez différentes espèces. Le DBDE quant à lui n'est pas métabolisé par les hépatocytes et sa mauvaise solubilité en culture cellulaire a freiné la caractérisation de ses effets toxicologiques.

## **I-4. Marqueurs d'exposition/ Marqueurs d'effets approche transcriptomique**

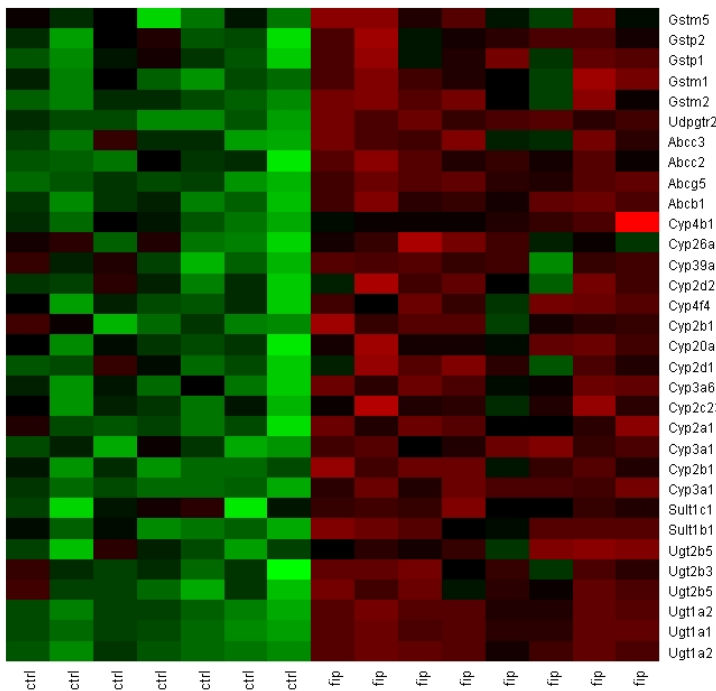
Notre équipe avait pour objectif d'identifier des marqueurs hépatiques d'exposition ou d'effet du Fipronil *in vivo* et d'identifier des voies potentielles empruntées par ce perturbateur pour exercer ses effets au niveau hépatique. Nous avons proposé pour cela une approche en 2 temps : 1) des criblages préliminaires sur puce à ADN commerciale permettant la mesure d'expression des transcrits à l'échelle du génome puis 2) l'enrichissement d'une puce à ADN dédiée pré-existante dans l'équipe (INRAArray).

### ***Déroulement du programme / évolution de la stratégie :***

Notre travail s'est concentré essentiellement sur le Fipronil mais au lieu de travailler sur une seule espèce (souris) comme initialement prévu, nous avons travaillé chez le rat et chez la souris, et avons développé des modèles cellulaires pour l'étude de l'activation du récepteur activé par les androgènes (CAR). Le travail chez le rat, réalisé en collaboration avec l'équipe de Catherine Viguié, a été conduit suite à la démonstration par cette équipe des effets de perturbation thyroïdienne dans cette espèce {Leghait, 2009}. Nous avons néanmoins poursuivi le travail chez la souris dans la perspective d'utiliser des modèles transgéniques invalidés pour démontrer formellement l'implication de récepteurs nucléaires comme médiateur des effets du Fipronil (voir ci-dessous). Enfin, des résultats préliminaires inattendus nous ont amenés à développer une



**Fig. 16:** Régulation hépatique de l'expression de trois gènes cibles du récepteur nucléaire CAR lors d'un traitement au fipronil chez la souris.



**Fig. 17 :** Régulation de gènes du métabolisme hépatique des xénobiotiques par le Fipronil. ctrl (resp. fip) : rats contrôles (resp. traités au fipronil). Gst : glutathion S-transférases, Ugt : UDP-glucuronosyl-transférases, Sult : sulfotransférases, Cyp : cytochromes P450, Abc : ABC transporteurs

nouvelle voie d'investigation sur la régulation par les récepteurs nucléaires de l'expression d'un gène impliqué dans le métabolisme des hormones thyroïdiennes.

En termes d'outils, les premiers criblages pangénomiques que nous avons réalisés chez la souris, ont indiqué qu'un grand nombre de cibles modulées *in vivo* par le Fipronil n'étaient pas présentes sur notre puce à ADN dédiée INRAArray. Ces résultats nous ont permis d'enrichir progressivement cette puce à ADN mais avons rapidement eu recours préférentiellement à la PCR quantitative en temps réel (QPCR) pour confirmer les modulations observées, en raison de la plus grande sensibilité et d'une précision accrue de cette méthode. Notre puce à ADN dédiée étant spécifique de la souris, nous avons eu directement recours, chez le rat, à l'utilisation de puces à ADN pangénomique (Agilent 4x44K).

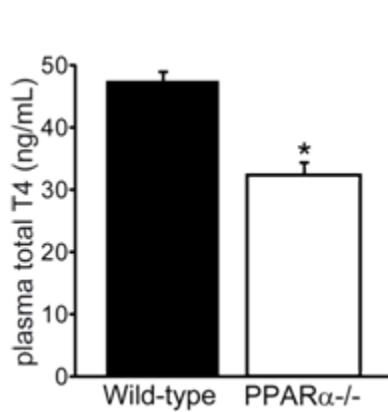
### ***Criblage des effets transcriptionnels hépatiques du Fipronil chez la souris :***

Le foie joue un rôle majeur dans le métabolisme des xénobiotiques. De nombreux systèmes enzymatiques impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques interviennent également dans le métabolisme des hormones et métabolites endogènes. Au niveau hépatique, l'expression des enzymes du métabolisme des xénobiotiques est largement contrôlée au niveau transcriptionnel par des récepteurs nucléaires {di Masi, 2009} tels que les récepteurs PXR (Pregnane X Receptor) et CAR (Constitutive Androstane Receptor). Alors que le Fipronil constitue un activateur relativement faible du récepteur PXR {Lemaire, 2006}, aucune donnée n'est actuellement disponible sur une activation potentielle de CAR. Pourtant, ce récepteur joue un rôle important dans l'induction de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme hépatique des hormones thyroïdiennes {Maglich, 2004 ;Qatanani, 2005;Tien, 2007 }.

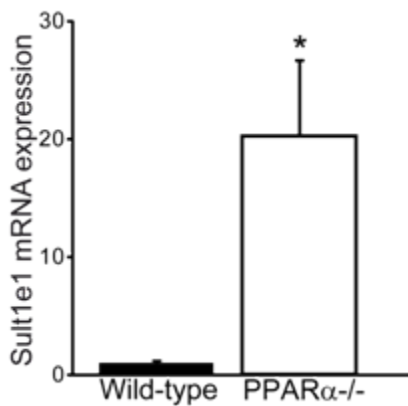
Dans un premier temps, nous avons donc cherché à identifier sans *a priori* les gènes dont l'expression était sensible à une exposition au Fipronil chez la souris (5 mg/kg/j, 14 j., n=10/lot). Nous avons réalisé un criblage préliminaire sur des puces pangénomiques (Agilent Whole Mouse Genome 44K) en utilisant des pools d'ARN issus de 10 souris traitées au fipronil (FIPRO) ou au véhicule seul (Ctrol). Ce criblage a révélé des modulations positives de l'expression de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques. Parmi les gènes dont nous avons confirmé les modulations par QPCR, nous avons en particulier noté la modulation significative de plusieurs gènes cibles bien décrits du récepteur CAR dont ceux décrits dans la figure 16.

La carboxylestérase 6 intervient dans le métabolisme dégradatif des insecticides, en particulier les pyréthroïdes {Huang, 2005;Stok, 2004}. Elle a été récemment identifiée comme un gène cible de CAR dans le foie {Xu, 2009}. Le cytochrome P450 2c55 (Cyp2c55) a été cloné en 2004 {Wang, 2004}. Également récemment décrit comme un gène cible de CAR et PXR {van Waterschoot, 2009}, il jouerait un rôle dans le métabolisme des ligands de ces récepteurs nucléaires dérivés de l'alimentation. Enfin Cyp2b10 est un gène cible prototypique du récepteur CAR {Honkakoski, 1998} impliqué notamment dans le métabolisme de la testostérone au niveau hépatique (activité testostérone 16 $\alpha$ -hydroxylase). Compte tenu des facteurs d'inductions conséquent de ces différentes cibles (>15 fois pour Cyp2b10), le fipronil peut être considéré comme un inducteur efficace de plusieurs systèmes de biotransformation hépatique. Certains systèmes de biotransformation, notamment les UDP glucuronosyl-transférases (Ugt) et les sulfotransférases (Sult), étant impliqués dans le métabolisme hépatique des hormones thyroïdiennes du moins chez les rongeurs {Kelly, 2000}, il est possible que l'induction de l'expression de ces enzymes contribuent à accroître la clairance des hormones thyroïdiennes {Curran, 1991}.

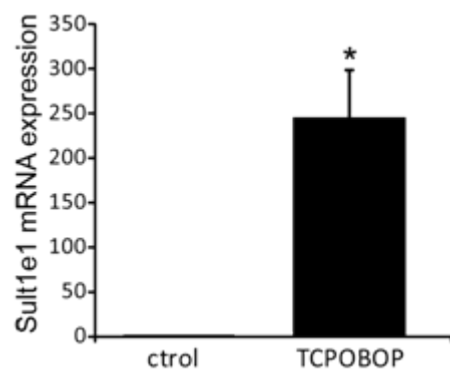
### ***Criblage des effets transcriptionnels hépatiques du Fipronil chez le rat :***



**Fig. 18:** concentration plasmatiques en T4 totale chez des souris C57BL/6J sauvages et invalidées pour le gène PPAR  $\alpha$ .



**Fig. 19:** surpression du gène codant pour l'enzyme sult1e1 chez des souris invalidées pour le gène PPAR  $\alpha$ .



**Fig. 20:** surpression du gène codant pour l'enzyme sult1e1 chez des souris traitées par un agoniste du récepteur CAR (TCOBOP).

Nous avons donc cherché à évaluer les effets transcriptionnels hépatiques du Fipronil chez le rat, espèce chez laquelle l'équipe de C. Viguié a démontré les effets du Fipronil sur la clairance des hormones thyroïdiennes {Leghait, 2009}. Nous avons pour cela eu recours à un criblage de plus grande ampleur (n=8 individus/lot, puces pangénomiques Agilent Whole Mouse Genome 4x44K portant environ 44000 spots) dans le but de caractériser au mieux la réponse hépatique au Fipronil dans cette espèce. Les résultats de ce criblage montrent que le Fipronil induit l'expression de gènes impliqués dans toutes les étapes du métabolisme hépatique des xénobiotiques chez le rat (Fig. 17).

Parmi les gènes régulés, on constate la présence de gènes cibles bien décrits du récepteur CAR comme les cytochromes P450 2B, 2C et 3A (Fig. 2), des UDP-glucuronosyltransférases (Ugt, Fig.17) et des sulfotransférases (Sult, Fig. 17). Certains de ces gènes cibles de CAR, et notamment l'Ugt1a1 et les Sulfotransférases Sult1b1 et Sult1c1 sont impliqués dans le métabolisme hépatique des hormones thyroïdiennes {Maglich, 2004}.

Nous avons d'ores et déjà confirmé plusieurs de ces régulations par QPCR et poursuivons actuellement ces travaux de confirmation, à la fois chez la souris et chez le rat, en incluant également d'autres gènes codant des protéines impliquées dans le métabolisme hépatique des hormones thyroïdiennes comme les déiodases.

Ces résultats démontrent que le Fipronil possède un puissant pouvoir inducteur des gènes du métabolisme hépatique des xénobiotiques *in vivo*.

### ***Modulation de l'expression d'une enzyme du métabolisme des hormones thyroïdiennes par les récepteurs nucléaires :***

Au cours de ce programme, nous avons découvert fortuitement que des souris déficientes pour l'isoforme  $\alpha$  du récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR $\alpha$ ) présentaient des taux anormalement faibles de T4 (Fig. 18). Compte tenu du rôle important du récepteur PPAR $\alpha$  dans le contrôle du métabolisme hépatique {Mandard, 2004}, nous avons recherché si des gènes impliqués dans le métabolisme hépatique des hormones thyroïdiennes pouvaient être exprimés de manière différentielle entre des souris de type sauvage et des souris déficientes pour PPAR $\alpha$ . Nous avons ainsi identifié que la sulfotransférase Sult1e1, une enzyme impliquée dans le métabolisme des estrogènes mais qui contribue également au métabolisme des hormones thyroïdiennes {Kester, 1999} était surexprimée environ 20 fois chez les souris PPAR $\alpha$ -/- par rapport aux souris contrôles (Fig. 19). L'expression de Sult1e1 est particulièrement sensible à l'activation de CAR (Fig. 20) par un agoniste synthétique (TCPOBOP) et cet effet est indépendant de l'expression de PPAR $\alpha$  (données non présentées). A l'opposé, le fénofibrate, activateur synthétique du récepteur PPAR $\alpha$  régule négativement l'expression de Sult1e1 uniquement chez les souris sauvages et pas chez les souris déficientes pour le récepteur PPAR $\alpha$  (données non présentées).

Nous étudions actuellement la régulation de l'expression de Sult1e1 par le Fipronil ainsi que par d'autres contaminants perturbateurs endocriniens tels les phthalates {Eveillard, 2009}.

### ***Le récepteur CAR est-il la cible du Fipronil ?***

Afin d'évaluer si CAR est activé par le Fipronil ou l'un de ses métabolites, nous avons développé une lignée cellulaire surexprimant ce récepteur nucléaire. De plus, nous avons généré deux autres lignées qui surexpriment, en plus de CAR, des ARN interférents (shRNA) qui diminuent spécifiquement l'expression de CAR. Ces lignées sont maintenant validées et ont été récemment utilisées pour démontrer que ce récepteur est la cible d'un plastifiant : le DEHP {Eveillard, 2009}. En revanche, nous n'avons pu mettre en évidence de régulation de Cyp2b10 par le Fipronil dans ces lignées. Il est possible que notre modèle cellulaire soit trop peu sensible pour détecter une potentielle activation de CAR par le Fipronil et nous travaillons donc actuellement à la

mise au point d'un test plus sensible de l'activation de CAR via l'utilisation d'un gène rapporteur et de transfections transitoires. Il est également possible que ce ne soit pas le Fipronil mais l'un de ses métabolites qui active le récepteur CAR. Nous testerons prochainement cette hypothèse sur nos modèles cellulaires.

En parallèle, nous avons récemment obtenu de la part du Dr David D Moore (Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA), un accord de transfert des souris invalidées pour le récepteur CAR. Nous avons pu récupérer cette lignée sous la forme d'embryons congelés via le Dr Urs A. Meyer (Biozentrum, Bâles, Suisse) et avons obtenu des premières naissances après réimplantation fin novembre 2009. Après avoir réalisé les croisements nécessaires (souris actuellement hétérozygotes CAR+/-), ce nouveau modèle nous permettra de tester *in vivo* le rôle de ce récepteur nucléaire dans les effets du Fipronil au niveau hépatique et d'évaluer si CAR est impliqué dans la perturbation thyroïdienne provoquée par le Fipronil.

### ***Conclusions / perspectives***

Ce programme de recherche nous a permis de mieux caractériser la réponse transcriptionnelle hépatique au Fipronil *in vivo*. **Celle-ci est caractérisée par une induction de l'expression d'un large panel de gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques.** Il est probable que certains de ces gènes participent à **l'élimination du Fipronil par l'organisme mais il est également vraisemblable qu'ils contribuent à induire une perturbation thyroïdienne via un accroissement du métabolisme hépatique des hormones thyroïdiennes.** La nature des régulations induites par le Fipronil suggèrent fortement l'implication du récepteur CAR, en plus du récepteur PXR. Nos travaux actuels se concentrent sur l'évaluation de cette hypothèse par des approches *in vitro* et *in vivo*. Par ailleurs, ce programme nous a également conduit à identifier de nouvelles voies de régulation de Sult1e1, une enzyme impliquée dans le métabolisme hépatique des hormones thyroïdiennes. La forte surexpression hépatique de ce gène chez les souris PPAR $\alpha$ -/- nous donnera l'opportunité d'étudier dans le futur le rôle précis joué par cette enzyme dans le métabolisme hépatique des hormones thyroïdiennes ainsi que sa régulation par divers perturbateurs endocriniens.

## ***I-5. Effets physiopathologiques sur les systèmes endocriniens d'intérêt***

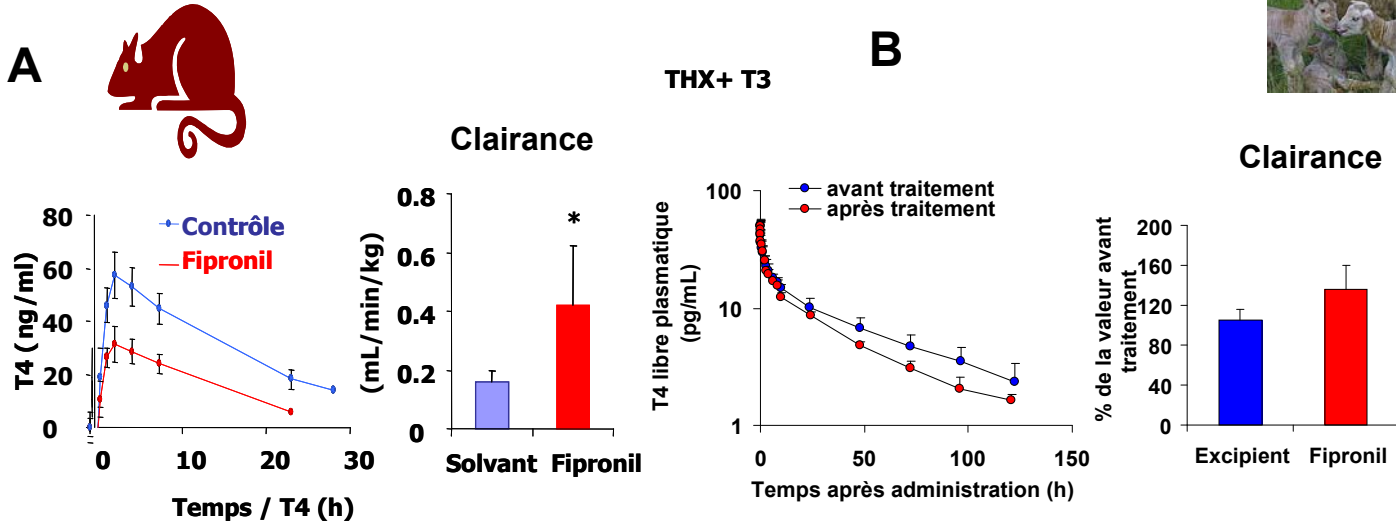
### **I-5.1. Caractérisation des effets sur les axes thyroïdiens et corticotrope *in vivo*, action périphérique**

Aucune étude à l'heure actuelle ne s'est attachée à l'étude de perturbateurs de la fonction corticotrope. Quant à la fonction thyroïdienne, la plupart des études de laboratoire ont été effectuées chez le rat qui présente un schéma de régulation de cette fonction très différent de celui de l'homme notamment en ce qui concerne les protéines de transport spécifique. Ces deux points soulignent la nécessité d'une évaluation précise du potentiel perturbateur endocrinien dans des modèles animaux pertinents. Notre objectif était donc de développer pour ce projet, un modèle ovin qui présente le double avantage de posséder des schémas de régulation des fonctions thyroïdienne et corticotrope similaires à celui de l'homme.

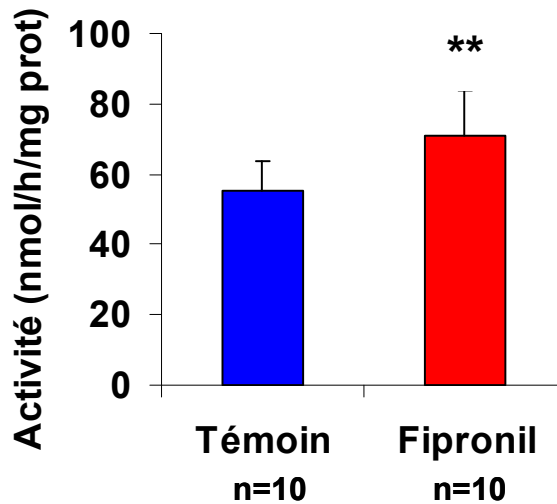
Les effets de nos molécules d'intérêt sur les paramètres de base des systèmes endocriniens étudiés (profils de sécrétion hormonale et paramètres de l'élimination des hormones thyroïdiennes) ont été déterminés dans l'espèce ovine en parallèle avec le rat en tant qu'espèce de référence en toxicologie.







**Fig. 21:** Effets d'un traitement au fipronil par voie orale (A:3mg/kg/j pour la rate) et (B: 5mg.kg tous les 4 jours pour la brebis) sur la clairance de la thyroxine (T4) évalués sur des animaux dépourvus de sécrétion endogène de T4 (thyroïdectomie) et maintenus "euthyroïdiens par administration de T3. La clairance de la thyroxine est estimée à partir de la cinétique de décroissance des concentrations plasmatiques en T4 suite à une administration unique de T4.



**Fig. 22 :** Effet d'un traitement au fipronil par voie orale chez la rate (3mg/kg/j X 14 jours) sur l'activité UDPGT hépatique. L'activité enzymatique a été évaluée sur fraction microsomale provenant de foies d'animaux traités au solvant (témoin) ou au fipronil (fipronil) par mesure du taux de glucuroconjugaison du 4-nitrophénol.

## Schéma physiopathologique de l'action perturbateur thyroïdien du fipronil dans l'espèce de référence en toxicologie réglementaire: le rat :

Cette partie du projet constitue l'étape initiale d'un travail thèse msie en œuvre dans le cadre de ce projet (Leghait thèse d'université 2009). Un modèle original permettant de mesurer *in vivo* la clairance de la thyroxine : animaux dépourvus de sécrétion endogène de T4 par thyroïdectomie et maintenus « euthyroïdiens » par administration de T3 (THX=T3) a du être développé. Une série d'expérimentations réalisées dans ce modèle a confirmé l'effet perturbateur thyroïdien du fipronil chez le rat en montrant une très nette augmentation de la clairance (i.e de l'élimination) de la T4 sous forme libre et liée chez des animaux traités au fipronil (Fig. 21A). D'un point de vue mécanistique, nous avons pu relier cette perturbation à une activation *in vivo* de systèmes enzymatiques hépatiques dont certains ont un rôle avéré dans le catabolisme des hormones thyroïdiennes chez le rat (Uridine diphospho-glucuronosyltransférase, UDPGT, Fig. 22).

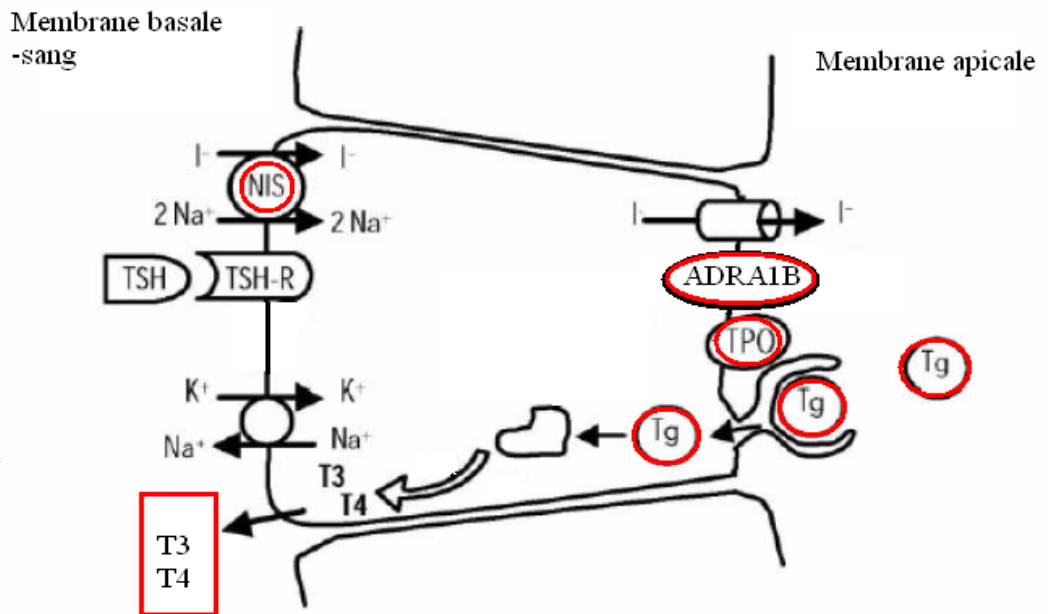
**Ce modèle nous a également permis de montrer que les modifications de clairance de T4 constituent un biomarqueur beaucoup plus précoce et sensible de l'effet perturbateur thyroïdien du fipronil que ne le sont les modifications des concentrations circulantes en hormones.** Un traitement au fipronil induit en effet une augmentation de la clairance de la T4 de l'ordre de 200% alors que la diminution des concentrations circulantes en T4 qui en résulte est limitée à 25%. Par ailleurs, cette observation suggère que **des mécanismes compensateurs** pourraient être mis en place afin de limiter la perte en hormones thyroïdiennes. Afin d'explorer cette hypothèse, une approche transcriptomique (puce à ADN pangénomique, Adgilent) a été mise en place grâce à une collaboration avec l'UR 66 (P Martin) sur la thyroïde. Cette approche a permis de mettre en évidence la surexpression chez des animaux traités au fipronil de plusieurs gènes « TSH dépendants » codant pour des protéines impliquées dans les voies de synthèse des hormones thyroïdiennes et/ou la dynamique cellulaire et l'implication potentielle des récepteurs noradrénergiques de la glande thyroïde dans l'instauration de ces mécanismes compensateurs (Fig. 23). La caractérisation de l'exposition interne des animaux, a permis de mettre en évidence que **ces effets sur la fonction thyroïdienne se produisent sous une exposition infime au fipronil lui même mais extrêmement élevée à son métabolite persistant, le fipronil sulfone (cf.I-1-1).**

## Ré-évaluation du potentiel perturbateur thyroïdien du fipronil dans l'espèce ovine.

Une fois clairement établi le schéma physiopathologique de l'action du fipronil en tant que perturbateur thyroïdien chez le rat, nous avons cherché à déterminer si ce schéma se reproduisait à l'identique dans l'espèce ovine plus proche de l'homme que le rat en termes de physiologie thyroïdienne. (Leghait et al, 2010 accepté dans Toxicology letters). La perturbation thyroïdienne associée à un traitement au fipronil par voie orale dans l'espèce ovine se limite à une faible augmentation (25%) de la clairance de la forme libre de la T4 (Fig. 21B). En effet ni la clairance de la T4 totale, constituée à 99,9% de T4 liée à ses protéines de liaison plasmatiques, ni les profils des concentrations circulantes en HT et TSH ne sont significativement modifiées par le traitement. De même, les effets inducteurs sur les systèmes enzymatiques hépatiques mis en évidence chez le rat, à travers l'augmentation de la clairance de l'antipyrine, n'ont pu être retrouvés chez le mouton (Fig.2).

Une hypothèse pouvant expliquer cette divergence entre le rat et le mouton en terme d'induction enzymatique serait que le fipronil pourrait être chez le rat un ligand de récepteurs nucléaires « xénosenseurs » tels que CAR et/ou PXR impliqués dans des mécanismes d'induction enzymatique au niveau hépatiques. Cette hypothèse rejoint les hypothèses mécanistiques qui ont motivé l'évolution de stratégie de l'équipe de P martin.

	Fonctions biologiques
<b>ADRA1B</b>	Organification iode
<b>AREG</b>	Dynamique cellulaire
<b>HDAC10</b>	Cancer thyroïde
<b>PTGS1</b>	Synthèse prostaglandines
<b>RHOA</b>	Prolifération cellulaire
<b>NIS</b>	Captation iode
<b>TPO</b>	Synthèse hormones thyroïdiennes
<b>TG</b>	Précurseur hormones thyroïdiennes



**Fig. 23:** Gènes surexprimés dans la thyroïde de rats exposés au fipronil et fonctions associées. La figure représente le schéma physiopathologique suggéré par ces résultats: mécanisme compensateur par activation de gènes clefs de la synthèse des HT sous contrôle de la TSH hypophysaire et/ou de récepteurs adrénérgiques de la thyroïde.

**En parallèle avec ces différences quantitatives entre le rat et le mouton dans les effets d'un traitement un fipronil, les profils d'exposition interne au fipronil et à son principal métabolite le fipronil sulfone différaient de façon importante entre les deux espèces.** Ainsi, chez le mouton, le rapport entre les concentrations plasmatiques en métabolite sulfone et celles du fipronil ne dépassait jamais 6 à l'état d'équilibre alors qu'il était estimé entre 500 et 1000 chez le rat. **Cette différence d'exposition nous a conduits à émettre l'hypothèse selon laquelle le fipronil sulfone serait un perturbateur thyroïdien beaucoup plus important que le fipronil lui-même.** Cette hypothèse nous a conduits à orienter la suite de ces travaux vers la toxicologie comparative du fipronil et de son principal métabolite, fipronil sulfone, en relation avec le métabolisme des hormones thyroïdiennes. (B Roques M2/Thèse )

#### **I-5.2. Approche mécanistique : détermination du niveau d'interaction avec les axes hypothalamo-hypophysaire thyroïdien ou corticossurrénalien**

L'objectif général de cette partie du projet était de discriminer les mécanismes périphériques des mécanismes centraux dans l'altération de la fonction thyroïdienne. Initialement il était prévu d'étudier la possibilité d'effets : 1) nerveux centraux sur la sécrétion des neuropeptides hypothalamiques ; 2) hypophysaires et 3) de déterminer si le fipronil pouvait agir comme agent agoniste ou antagoniste des récepteurs aux hormones thyroïdiennes. **Les résultats obtenus *in vivo* chez le mouton et le rat, plaident en faveur d'un mécanisme d'action du fipronil et/ou de son métabolite essentiellement périphérique impliquant le métabolisme des hormones thyroïdiennes.** Cependant, on ne pouvait totalement exclure l'hypothèse qu'une action sur le système nerveux, cible primaire de l'insecticide, et/ou l'hypophyse participait également à l'augmentation de la sécrétion de TSH mises en évidence chez les rats traités (Leghait et al., 2009). Nous avons donc réorienté nos approches de façon à avoir une évaluation plus « générique » d'éventuels mécanismes d'action centraux ou hypophysaires en nous intéressant d'une part aux effets cellulaires sur une lignée modèle de cellules neuronales différenciées et d'autre part, en élaborant une approche modélisatrice permettant d'évaluer dans son ensemble la régulation de la sécrétion hypophysaire de la TSH.

L'hypothèse d'une action directe du fipronil ou de son métabolite au niveau des récepteurs aux hormones thyroïdienne n'a pas été poursuivie pour des raisons méthodologiques (problème de culture des lignées cellulaires « thyroïdo-dépendantes » GH3 et GH4C1, HP75 et LI) mais également parce qu'aucun des résultats obtenus chez le mouton ou le rat ne permettait de s'orienter vers cette hypothèse.

#### Evaluations d'effets potentiels sur le système nerveux central

Nous avons décidé de caractériser les effets potentiels et/ou la toxicité du fipronil sur des neurones dopaminergiques qui composent en grande partie l'hypothalamus organe central du contrôle nerveux de toutes les fonctions endocriniennes. Il existe en outre une régulation dopaminergique de la sécrétion de la TSH hypophysaire, hormone contrôlant directement la fonction de la glande thyroïde (Brabant et al., 1989).

La lignée cellulaire SH-SY5Y, bien que d'origine extra-hypothalamique, a été utilisée **comme modèle** car elle exprime clairement des caractéristiques dopaminergiques. Les cellules SH-SY5Y sont issues de la troisième génération de neuroblaste subclonée à partir de la lignée SH-SY5 qui provient d'une tumeur métastatique de moelle osseuse. Les cellules SH-SY5Y sont des neurones immatures pouvant être différenciés présentant une forte capacité de prolifération et exprimant des

caractéristiques phénotypiques de plusieurs types neuronaux. Ces cellules sont généralement utilisées en temps que modèles dopaminergique, adrénnergique et cholinergique, ce qui leur a valu une large utilisation dans le domaine des neurosciences {Vaughan, 1995}.

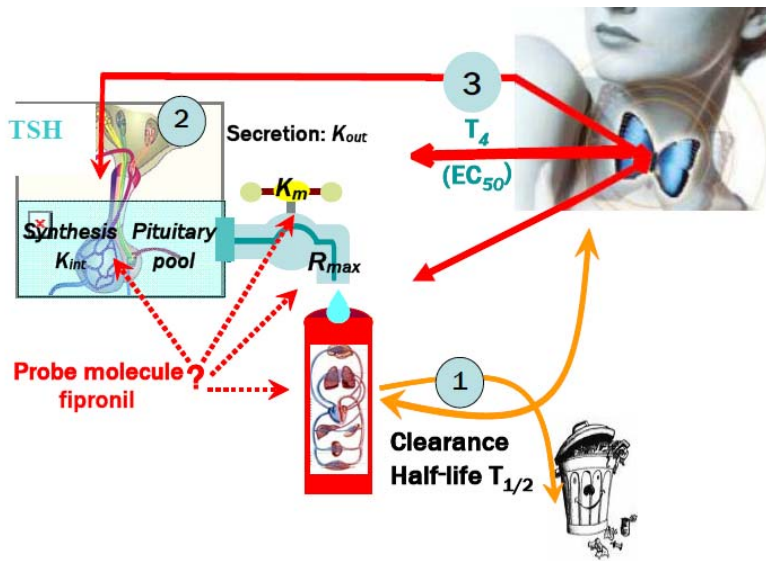
Dans un premier temps, nous avons montré la cytotoxicité (libération de la LDH) du fipronil (0-150  $\mu\text{M}$ ) sur les cellules SH-SY5Y et nous avons alors décidé de caractériser le type de mort induit par le fipronil. L'examen plus approfondi de cellules SH-SY5Y exposées au Fipronil révèle plusieurs caractéristiques liées à une mort cellulaire par apoptose {Lesauskaite, 2002}. Dans cette étude, cinq événements cellulaires caractéristiques du processus d'apoptose ont été mis en évidence en présence de Fipronil (100 ou 150  $\mu\text{M}$ ) : La dépolarisation de la membrane mitochondriale (sonde JC-1 qui est un fluorochrome cationique dont les caractéristiques spectrales dépendent du potentiel de membrane mitochondrial analysée par cytométrie de flux), la sortie de cytochrome C dans le cytosol et l'activation de caspases effectrices (Western blot et immunomarquages), l'externalisation de la Phosphatidylsérine (analyse biparamétrique *in situ* par des sondes d'annexin-V-FITC et d'iodure de propidium en cytométrie de flux) et la destruction du matériel génétique (marquage *in situ* de la chromatine avec du Hoechst 33342). Par ailleurs, ce processus apoptotique semble dépendant des caspases puisque l'inhibiteur de caspase Z-VAD-fmk diminue la quantité de caspase-3 actives et la quantité de cellules positives à l'annexin-V tout en augmentant la viabilité cellulaire.

L'ensemble de ces observations rend compte de la nature pro-apoptotique du Fipronil sur des lignées neuronales et à forte dose. Dans le contexte de cette étude, une exposition de 24 h à 50-100  $\mu\text{M}$  de Fipronil déclenche une apoptose majoritairement par la voie intrinsèque chez 45 % des cellules SH-SY5Y. Il est intéressant de noter que les concentrations et le temps nécessaires pour que le Fipronil déclenche l'apoptose dans les cellules SH-SY5Y sont comparables à ceux d'autres pesticides reconnus comme neurotoxique *in vivo*. **De par ce fait, les résultats présentés dans ce chapitre permettent de souligner un nouvel aspect de la neurotoxicité du Fipronil : la stimulation de voies apoptotiques. L'impact de ces composés sur les phénomènes de neurodégénérescences et plus largement de dégénérescences cellulaires devra être évalué dans un contexte *in vivo*. Les études devront tout particulièrement s'axer sur les effets cellulaires à long terme après exposition chronique à de faibles doses de Fipronil.**

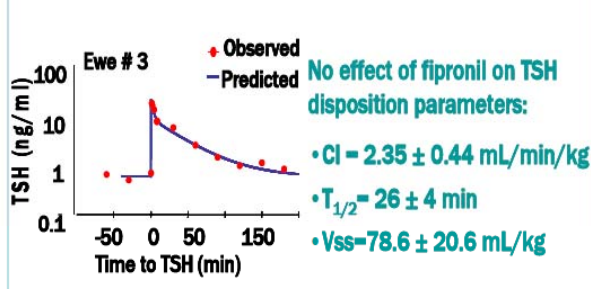
Pour préciser le mode d'action à l'origine des perturbations cellulaires observées dans cette étude, nous avons testé l'hypothèse selon laquelle le Fipronil pourrait altérer une composante mitochondriale du métabolisme énergétique. Ainsi, l'analyse du métabolisme mitochondrial de cellules SH-SY5Y exposées au Fipronil (5 à 100  $\mu\text{M}$ ) a révélé que les substrats entrant dans le cycle de Krebs étaient dégradés, mais que l'énergie libérée lors de leur dégradation, n'était pas traduite pour la formation d'ATP. Cette observation suggère que l'activité de la chaîne respiratoire n'est plus couplée à la synthèse d'ATP. L'effet découplant du Fipronil a donc été testé directement sur des mitochondries isolées afin de s'affranchir des mécanismes de régulation endogènes contrôlant la respiration cellulaire. Les résultats obtenus ont alors montrés que le Fipronil exerçait un effet découplant significatif y compris à faible concentration (5  $\mu\text{M}$  soit de l'ordre de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  concentrations plasmatiques atteintes pour le métabolite sulfone chez le rat et juste deux fois supérieure à l'exposition cumulée fipronil+ fipronil sulfone chez le mouton). Cet effet est caractérisé par une importante augmentation de la consommation d'oxygène consécutive à l'accélération de la chaîne respiratoire. Cette observation semble être également corroborée par l'augmentation de la production d'anion superoxyde par les cellules exposées au Fipronil.

**L'ensemble de ces résultats désigne la membrane mitochondriale interne comme cible secondaire de cet insecticide et permet de proposer un mode d'action inédit expliquant les atteintes cellulaires précédemment décrites. En effet, nous suggérons que le Fipronil exerce une action sur la membrane mitochondriale interne, qui conduit à la chute du gradient de**



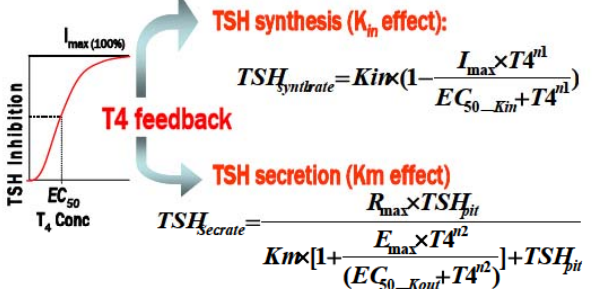


### 1 TSH Peripheral disposition



Time course of TSH plasma concentrations after an iv bovine TSH iv bolus at t=0 min to THX +T4 (10 µg/kg/day for 5 days) ewes . Data were fitted with a bi-compartmental model.

### 3 System challenged by T4: feedback potency



### 2 Steady-state: $K_{in} =$ plasma elimination

**Pituitary**

Secretion rate  $R_{max}$

$K_m$  Pituitary pool

$$\frac{dTSH_{pit}}{dt} = K_{in} - \frac{R_{max} \times TSH_{pit}}{K_m + TSH_{pit}}$$

Steady state  $\Rightarrow \frac{dTSH_{pit}}{dt} = 0$   $TSH_{pit} = \frac{K_{in} \times K_m}{R_{max} - K_{in}}$

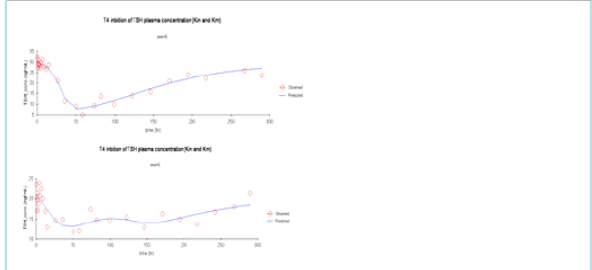
**Plasma**

Clearance  $Cl$

$$\frac{dTSH_{pl}}{dt} = \frac{R_{max} \times TSH_{pit}}{(K_m + TSH_{pit}) \times V_{ss}} - \frac{Cl}{V_{ss}} TSH_{pl}$$

Steady state  $\Rightarrow \frac{dTSH_{pl}}{dt} = 0$   $TSH_{pl} = \frac{K_{in}}{Cl}$

### Physiological relevance of the model



- **Conclusions:** our approach provides a simple physiologically-based model for global assessment of TSH regulation
- **Perspectives:**
  1. Include the thyroid level in the model : assessment of the whole pituitary-thyroid axis
  2. Development for use in the toxicological evaluation of potential thyroid disruptor

**Fig. 24** Schéma récapitulatif de l'approche modélisatrice développée pour caractériser la régulation de la sécrétion de l'hormone hypophysaire contrôlant la fonction thyroïdienne, la Thyroid Stimulating Hormone (TSH) et l'impact de perturbateurs potentiels de cette régulation (probe molécules). L'approche est constituée de 3 étapes : 1) détermination des paramètres pharmacocinétiques de la TSH, 2) détermination des paramètres caractérisant le taux de synthèse et la libération de TSH à l'équilibre et 3) détermination des paramètres d'efficacité et de puissance du rétrocontrôle négatif de l'hormone thyroïdienne thyroxine, T4, sur la synthèse et la libération de TSH. La pertinence physiologique du modèle est évaluée à travers la qualité de l'ajustement par le modèle des données expérimentales de l'évolution temporelle des concentrations en TSH lors d'un rétrocontrôle ponctuel par la T4.



**protons existant de part et d'autre de cette membrane. L'affaiblissement de la force protomotrice crée par ce gradient, ralentit la synthèse d'ATP, et constitue *in fine* un signal d'entrée en apoptose.** Tous les résultats exposés devraient être valorisés par une publication.

Nous avons réunis des éléments de preuves permettant d'affirmer que le Fipronil, et sans doute d'autres Phénylpyrazoles, présentent des propriétés de découplant de la phosphorylation oxydative. La mise en évidence de la mitochondrie en tant que cible secondaire des Phénylpyrazoles suggère que ces insecticides peuvent exercer une toxicité indépendamment de leur action gabaergique. La mécanistique du système de phosphorylation oxydative étant similaire chez l'ensemble des eucaryotes hétérotrophes, il est à craindre que le Fipronil altère l'état énergétique de plusieurs systèmes cellulaires. Par conséquent, le mode d'action du Fipronil décrit dans cette étude sera à considérer avec attention car il pourra expliquer des conséquences physiopathologiques non attribuables à l'action gabaergique de cet insecticide.

#### Evaluation d'effets sur la régulation hypophysaire de la fonction thyroïdienne

Nous avons développé chez l'ovin une méthode basée sur une approche pharmacocinétique simple et de modélisation permettant d'évaluer l'effet d'une substance sur les principales voies de régulation de la plaque tournante de la fonction thyroïdienne : la sécrétion de TSH. Expérimentalement, cette méthode repose sur 3 étapes (Fig.24): 1) évaluation des paramètres pharmacocinétiques de l'hormone hypophysaire contrôlant la fonction endocrine étudiée (TSH pour la thyroïde, LH pour la reproduction) dans des conditions de suppression de la sécrétion endogène de ces hormones, 2) évaluation du taux de sécrétion basale de cette hormone hypophysaire en conditions physiologiques à l'équilibre et, 3) détermination de l'efficacité et de la puissance des hormones périphériques en termes de rétrocontrôle négatif sur la sécrétion des hormones hypophysaires en utilisant une approche de dose unique (par opposition aux approches plus classiques de dose/réponse) basée sur la modélisation de la relation entre les concentrations plasmatique en hormone périphérique (T4) et celles en hormone hypophysaire sur un animal placé en condition d'hypersécrétion de l'hormone hypophysaire. L'ajustement des données permet d'évaluer sur un même animal les paramètres pharmacocinétiques de T4 et TSH, la modélisation de la relation concentration plasmatique en TSH en fonction de la concentration en T4 permet elle d'estimer le pool de TSH hypophysaire, la capacité maximale de synthèse et de libération de TSH par l'hypophyse, l'efficacité des facteurs de libération de la TSH et les paramètres de l'efficacité et de la puissance de la thyroxine à inhiber la sécrétion et/ou la synthèse de TSH. Ce modèle pourrait donc s'avérer un **outil particulièrement performant pour l'évaluation générique des perturbateurs thyroïdiens potentiels agissant sur la régulation de sécrétion de TSH. Le modèle peut également être très facilement adapté pour évaluer et caractériser en terme de puissance et d'efficacité de potentiels effets (ant)agonistiques des hormones thyroïdiennes en prenant le rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de TSH comme biomarqueur.**

Pour le fipronil, nos résultats indiquent clairement qu'un traitement au fipronil dans l'espèce ne modifie aucun des paramètres clefs de la sécrétion de TSH.

## II - PARTIE 2 : PBDE

Bien que totalement conscient des énormes difficultés méthodologiques inhérentes à ce type de molécule, l'ensemble de acteurs de ce projets avait quand même décidé de les inclure du fait de leur importance potentielle en tant que contaminant environnemental pouvant cibler la fonction thyroïdienne. Le peu de données disponibles pour les RFPB et plus particulièrement le DBDE a été en outre un facteur de motivation important. Toutefois, il est aisé de comprendre que ces difficultés méthodologique ont constitué pour l'ensemble des partenaires un frein important ce qui explique que l'on ait une figure beaucoup moins accomplie des schémas d'exposition et d'action physiopathologique pour le PBDE que pour le fipronil.

### II -1. Facteurs modulant l'exposition

#### II -1.1. Transport cellulaire et plasmatique (UR 66 A Lespine)

##### Interaction avec les transporteurs d'efflux

Une approche identique à celle mise en place pour le fipronil et son métabolite a été utilisée pour suivre l'effet inhibiteur du DBDE sur les transporteurs ABC. Pour ce composé, une gamme de concentrations de 1 à 6  $\mu\text{M}$  a été utilisée. Cette gamme de concentrations est à mettre en correspondance avec les concentrations plasmatiques circulantes de l'ordre du nanomolaire (thèse A Riu). Dans cette gamme, le DBDE n'apparaît pas être inhibiteur de la Pgp murine, de MRP ni de BCRP. En raison du caractère extrêmement lipophile du composé, nous avons également testé l'effet d'intralipide (20%, Fresenius Kabi) qui est largement utilisé comme solubilisant pour des composés lipophiles. Le vecteur "intralipide" n'interfère pas avec la Pgp murine et n'a pas conduit à une modification des résultats précédemment cités.

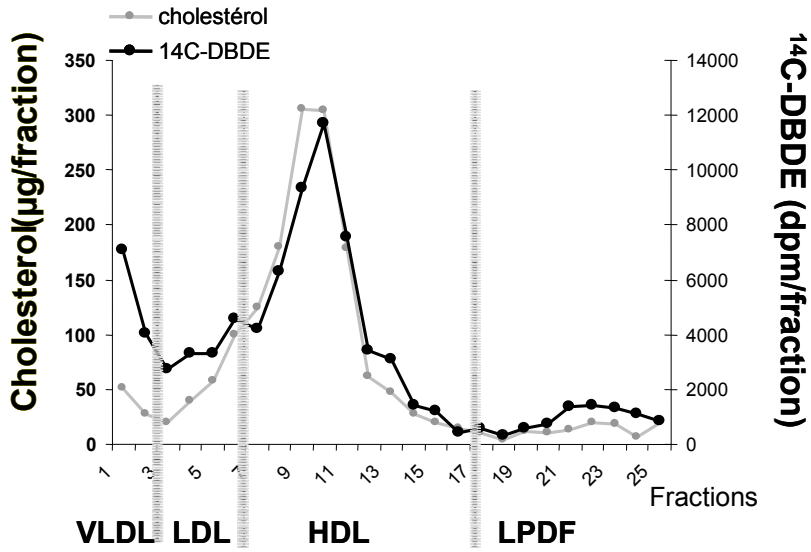
**Conclusion : Le DBDE à des concentrations proches des concentrations caractérisées chez l'homme (1 à 6  $\mu\text{M}$ ) n'inhibe aucun des transporteurs ABC d'efflux étudiés ici.**

##### Transport plasmatique du DBDE.

Le transport plasmatique des xénobiotiques impacte leur devenir dans l'organisme. De par le caractère fortement lipophile du DBDE il est suggéré qu'il se lie aux lipoprotéines plasmatiques. Afin de vérifier ce point plusieurs approches complémentaires *in vivo* et *in vitro* sont mises en place.

**Méthodes :** Dans un premier temps, du plasma de rat est incubé *in vitro* avec du DBDE radioactif. Dans une deuxième étape le  $^{14}\text{C}$ -DBDE radiomarqué est administré par gavage à des rats. Le sang est prélevé et le plasma isolé. Les lipoprotéines sont fractionnées en une seule étape par ultracentrifugation sur gradient de densité en KBr. Après centrifugation les fractions sont analysées pour leur densité (densitomètre) leur concentration en cholestérol et leur radioactivité.

**Résultats :** Les pics de cholestérol observé dans la Fig 4 correspondent aux différentes fractions de lipoprotéines circulantes : les VLDL sont isolées à une densité de 1.002, les LDL à une densité de 1.063, les HDL à une densité de 1.21. La radioactivité se superpose parfaitement aux pics de cholestérol témoignant que le DBDE est associé dans le plasma aux lipoprotéines et essentiellement à la fraction des HDL qui est la plus importante chez le rat. On observe aussi une association



**Fig. 25 :** Profil de cholestérol et de <sup>14</sup>C-DBDE dans le plasma de rat après séparation par ultracentrifugation en gradient de densité

marquée avec les VLDL, bien que ces lipoprotéines ne soient pas très nombreuses chez le rat à jeun (Fig.25).

**Conclusion : Le DBDE se lie dans la circulation systémique aux lipoprotéines plasmatiques et notamment aux HDL.** Ces résultats ont été confirmés *in vitro* par incubation du DBDE radiomarqué avec du plasma. La liaison de ce composé aux HDL peut avoir un impact majeur sur son devenir dans l'organisme. En effet, les HDL ont pour rôle de transporter et amener le cholestérol vers le foie en vue de son élimination dans la bile. Il se pourrait que ce transport par les HDL favorise l'élimination du DBDE mais ce point reste à démontrer. De plus, une fraction du DBDE est liée aux VLDL et on peut s'attendre à ce que lors de dyslipémies associées à une perturbation du profil des lipoprotéines, le transport du DBDE soit aussi perturbé modifiant sa pharmaco- et sa toxicocinétique.

Perspectives :

Le DBDE est transporté dans la circulation par les HDL chez le rat. Des travaux *in vitro* devront être conduits pour établir le transport chez l'homme compte tenu du fait que le profil plasmatique des lipoprotéines est différent de celui du rat (plus de LDL et moins de HDL). De plus, l'étude du transport du DBDE devra être envisagée dans des plasmas de patients dyslipémiques (relation obésité).

## II -1.2. Voie métaboliques et profils d'exposition tissulaire (D Zalko)

Les données de la littérature concernant le métabolisme de PBDE sont extrêmement fragmentaires. Il apparaît que les concentrations de résidus de PBDE détectés dans les surrénales chez des rats ayant reçu une dose unique de  $^{14}\text{C}$ -PBDE sont équivalents à ceux mesurés dans le foie (D. Zalko, résultats non publiés), motivant de ce fait une recherche spécifique au niveau de cet organe. Par ailleurs, le profil métabolique chez l'homme reste à déterminer.

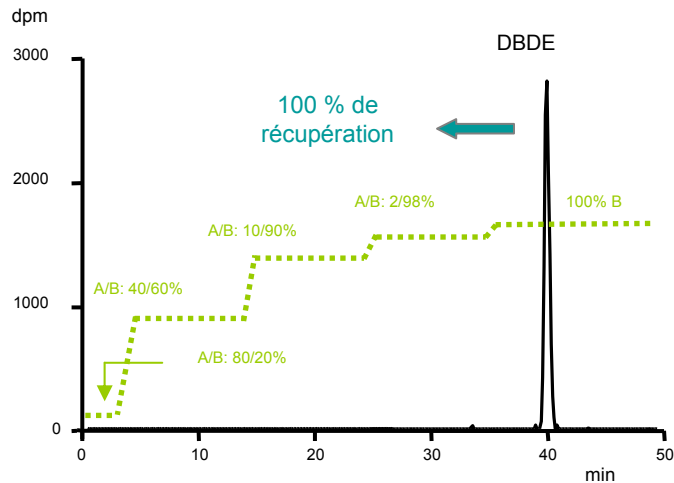
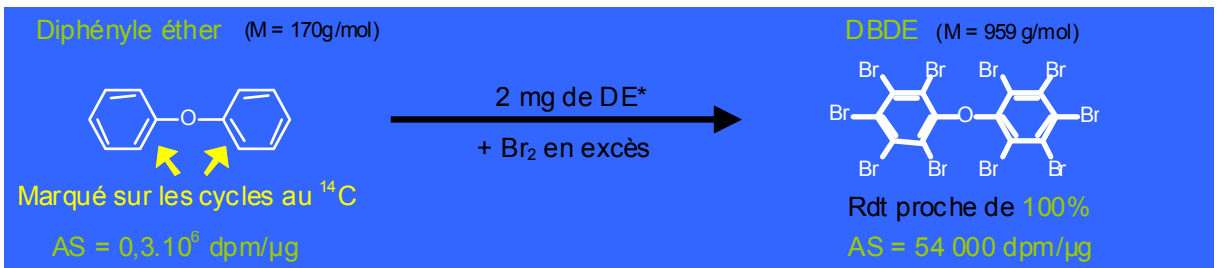
### Obtention des molécules marquées

**DBDE :** le  $^{14}\text{C}$ -DBDE a été synthétisé par bromation de diphenyle éther marqué sur les deux cycles aromatiques, dans les conditions décrites dans la fig.26.

### Etudes métaboliques *in vivo* (Fig. 27)

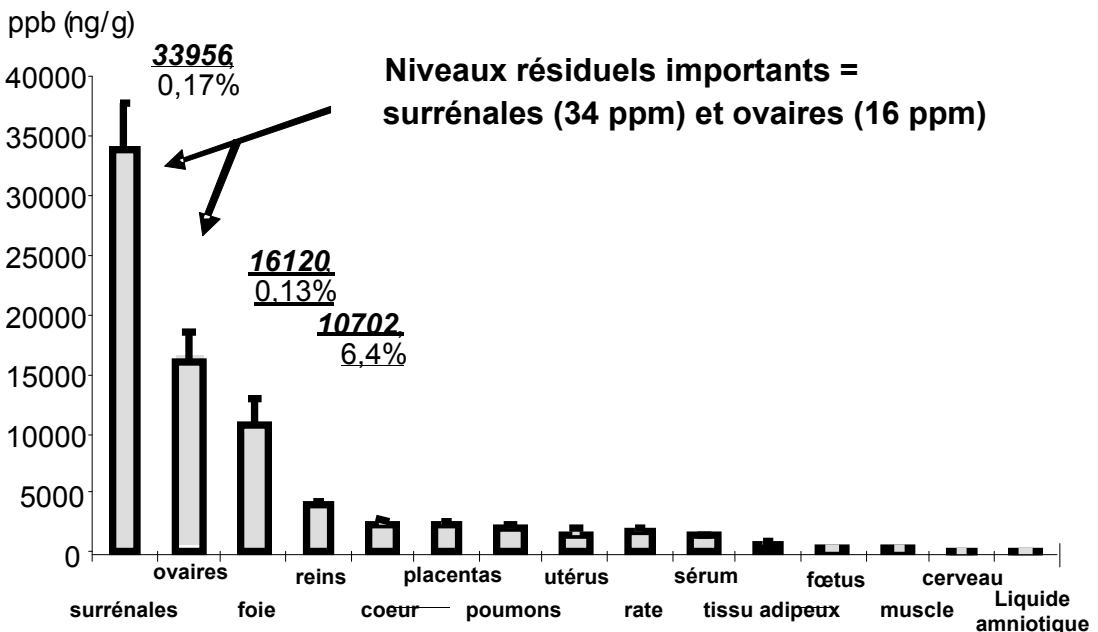
Trois rattes femelles Wistar adultes ont été réparties en cages à métabolisme. Chaque animal a reçu par gavage une dose de  $^{14}\text{C}$ -DBDE quotidienne aux jours 16, 17, 18 et 19 de la gestation, dans de l'huile d'arachide, à la dose théorique de 2mg/kg. Les urines et fèces ont été recueillies toutes les 24 heures. Au terme des 96 heures d'expérimentation et 24 heures après la dernière administration de  $^{14}\text{C}$ -DBDE, les rattes ont été abattues et disséquées. La radioactivité présente dans les échantillons a été évaluée selon les mêmes méthodes que pour le fipronil, et les différents échantillons ont été extraits comme détaillé dans Riu et al. 2008 pour déterminer les profils métaboliques.

La dose nominale effectivement administrée aux rattes a été évaluée à 2 mg/kg/jour de DBDE, après correction des doses théoriques par les pertes mesurées. La majeure partie de la radioactivité administrée a été retrouvée dans les fèces et le contenu digestif (Fig. 27). Cependant 20 % de la dose ont été détectés dans les tissus et dans le reste de la carcasse dont *ca.* 6,5 % dans le foie et *ca.* 0,5 % dans les fœtus. En dehors du foie, les concentrations résiduelles les plus importantes, ont été retrouvées dans les glandes surrénales (33  $\mu\text{g/g}$  de poids frais) et les ovaires (16  $\mu\text{g/g}$ ). Les profils



**Fig 26:** Gradient analytique mis au point pour purifier le DBDE et analyser ses métabolites. La radio-pureté du DBDE une fois purifié a été évaluée comme proche de 100%.

A = eau 100%  
B= méthanol 100%



**Fig 27 :** Profils de distribution tissulaire des résidus de DBDE chez la rate gestante

métaboliques obtenus à partir de l'extraction de la radioactivité présente dans les différentes matrices biologiques ont permis de démontrer que M2, un pic radioactif élué à 37 min, était le composé majoritairement retrouvé dans tous les tissus, à l'exception du tissu adipeux et de la carcasse. Les métabolites majoritaires ont pu être identifiés par LC-APPI-MS à partir des extraits fécaux et hépatiques. L'utilisation d'une molécule radio-marquée dont la pureté était proche de 100% démontre, chez la ratte, que la biodisponibilité du DBDE est bien supérieure à ce qui était précédemment publié, et que ce composé subit bien une débromation *in vivo*. Les biotransformations observées conduisent à la formation de nona-, octa- et hepta-BDEs présents tels quels ou sous forme de métabolites hydroxylés. Le passage trans-placentaire des PBDE a également été démontré.

### Etudes métaboliques *in vitro*

Comme pour le fipronil, des études comparatives ont été réalisées chez l'homme et chez le rat, en incubant différentes concentrations des molécules avec des hépatocytes humains et de rats en culture primaire, en collaboration avec R Rahmani.

La principale difficulté relative aux expérimentations avec le DBDE (et les PBDE en général) pour les expérimentations cellulaires est liée à la très faible solubilité de ces composés en milieu aqueux. Néanmoins, à l'aide de la molécule marquée, il a été possible de mettre au point les méthodes nécessaires à l'étude du métabolisme *in vitro* du DBDE, aux concentrations de 5  $\mu$ M (où il est soluble à 50%) et à 1  $\mu$ M (solubilité satisfaisante), qui constitue également le seuil de concentration limite pour lequel il est encore détectable par les analyses radio-HPLC. Dans les deux cas, après 24 heures d'incubation, et quelle que soit l'espèce, aucune métabolisation du DBDE ne se produit *in vitro*. Compte tenu des résultats obtenus *in vivo*, ceci implique que la métabolisation du DBDE, et en particulier sa débromation, ne se produisent qu'avec un très faible rendement, ou sont prises en charge par des bactéries du tube digestif, ou, que ces biotransformations sont extra-hépatiques. Des essais complémentaires sont actuellement réalisés avec des lignées cellulaires, pour comprendre si le DBDE pourrait être métabolisé au niveau des glandes surrénales.

## **II -2. Mécanismes physiopathologiques de perturbation thyroïdienne**

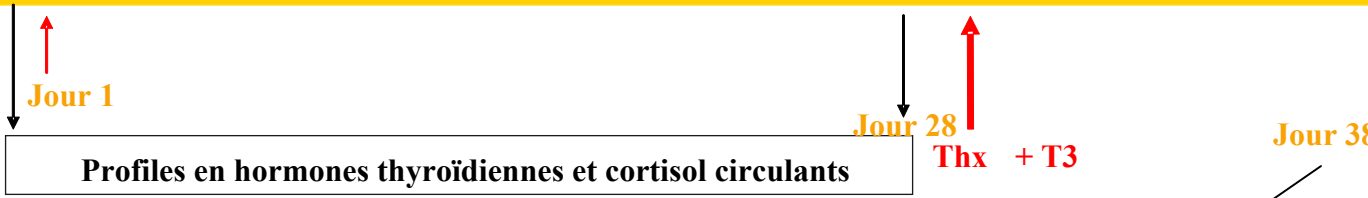
Certains PBDE, notamment les moins bromés, sont des perturbateurs thyroïdiens chez le rat : ils augmentent l'élimination des hormones thyroïdiennes, conduisant à une diminution de la T4 plasmatique et peuvent entrer en compétition avec la T4 vis-à-vis de la transthyrétine, la principale protéine de transport des hormones thyroïdiennes chez le rat (Zhou et al., . Cependant, l'extrapolation de la toxicité thyroïdienne des PBDE du rat à l'homme est entravée par le défaut d'expression chez le rat adulte de la thyroxine-binding globulin (TBG), principale protéine de liaison spécifique des hormones thyroïdiennes chez l'homme qui protège les hormones thyroïdiennes de leur élimination (Savu et al., 1991).

Dans le but d'évaluer le risque potentiel pour l'homme de l'utilisation des PBDE, nous avons étudié l'effet perturbateur thyroïdien du déca-BDE et du penta-BDE sur un modèle mouton, exprimant la TBG et donc pertinent vis-à-vis de l'homme (Fig. 28).

L'effet d'une faible dose de deux PBDE (le penta-mix et le décaBDE pur à 98 %, 100 ng/kg/j PBDE) sur la fonction thyroïdienne et corticosurrénalienne a été évalué sur 14 brebis (4 solvant, 5 brebis traitées au décaBDE et 5 au pentaBDE). Le schéma posologique retenu est pertinent par rapport à la consommation journalière moyenne estimée à 40 ng chez le nouveau né (Antignac et

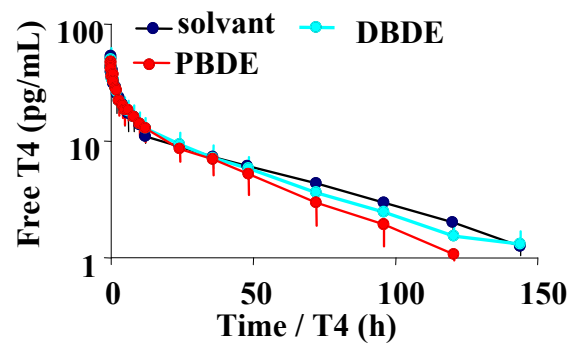
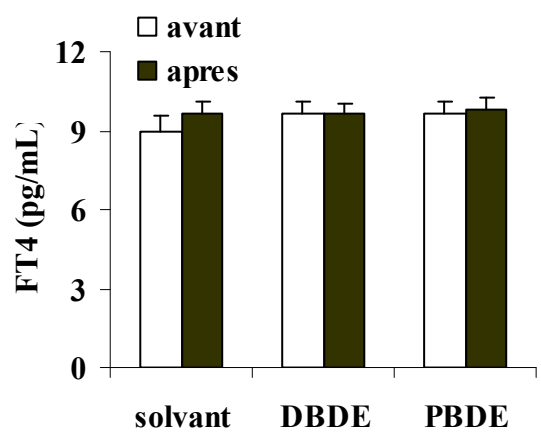


Traitement (3 groupes: solvant, pentamix, DBDE 100% pur - iv 100ng/kg/ day)



T4 Pharmacokinetic (D38)

Pharmacocinétique de la T4



Temps de demi-vie de la T4 libre

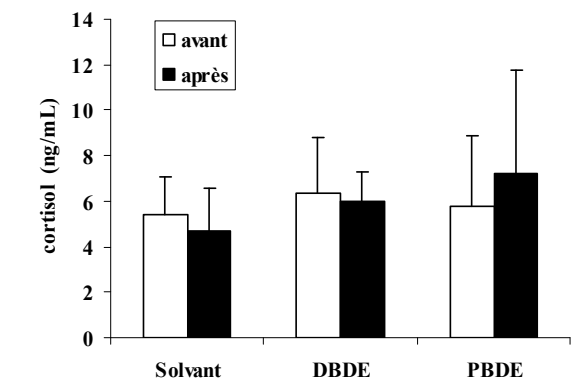
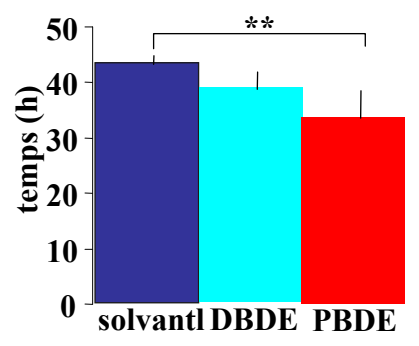


Fig.28 : effets d'une exposition faible (100ng/kg/j iv) à deux classes de PBDPE sur les profils hormonaux et la clairance de l'hormone thyroïdienne thyroxine chez la brebis.

al., 2009). Les profils de concentrations des hormones thyroïdiennes libres et totales et du cortisol n'ont pas été modifiés après 28 jours de traitement pentaBDE ou décaBDE (Fig. 28).

Ces brebis ont ensuite été thyroïdectomisées un mois après le début du traitement PBDE et maintenues euthyroïdiennes vis-à-vis de la T3 par une administration sc quotidienne de T3 (3 µg/kg/j).

Les PBDE n'ont pas modifié les paramètres pharmacocinétiques de la T4 totale, déterminés en évaluant la décroissance des concentrations plasmatiques de T4 après une administration IV de T4 (10 µg/kg ; Fig. 28). En revanche, le penta-mix a induit une diminution du temps de demi-vie et du temps moyen de résidence de la T4 libre, sans modification de la clairance de la T4 libre (Tab. 4).

Les paramètres de liaison de la T3 aux protéines de transport plasmatiques ont été déterminés ex vivo par dialyse à l'équilibre après 45 jours de traitement. Le traitement PBDE n'a pas modifié la liaison de la T3 aux protéines de transport. On note cependant que le traitement pentaBDE a tendance à augmenter le Kd du complexe TBG-T3 (0.896 ng/mL versus 0.556 ng/mL, ANOVA, P=0.16, Tab. 4) qui pourrait indiquer une baisse de l'affinité de la TBG pour les HT dont la T4. Il est à noter que face à une clairance importante, telle que celle observée pour la T4 libre, une telle diminution d'affinité pourrait expliquer la diminution du temps moyen de résidence et du temps de demi-vie de la T4 libre observée dans cette étude.

**Nos résultats obtenus chez l'ovine seraient en faveur d'une interaction des PBDE plus faiblement bromés avec la principale protéine de transport spécifique des HT chez l'homme et le mouton, la TBG à très faible dose (100 ng/kg/j). Il est à noter que ce type d'interaction n'aurait pu être mis en évidence sur un modèle rat adulte celui-ci n'exprimant pas la TBG. Ce résultat n'a pu être reproduit dans notre dispositif expérimental avec le composé décabromé mais il ne saurait être exclu que des réactions métaboliques au long terme de « débromation » puissent conduire aux mêmes effets lors d'exposition chronique.**

### III - Partie 3 : Valorisation

#### III -1. Communication en congrès internationaux

- C1. Viguié C, Leghait J, Puel S, Picard-Hagen N, Desmartin E, Cordoc'h S, Gayrard V, Toutain PL. Importance des différences interspécifiques de toxicocinétique dans l'évaluation du potentiel perturbateur thyroïdien d'un insecticide agro-vétérinaire, le fipronil.. <sup>a</sup> XXXIXème congrès du Groupe Français des Pesticides - 13-15 mai 2009, Toulouse. Communication orale
- C2. Collet S, Picard-Hagen N, Viguié C, Toutain PL, Gayrard V. Effects of the endocrine disrupting compound bisphenol-A on luteinizing hormone secretion in prepubertal ovariectomized ewe lambs.. ENDO2009 The Endocrine Society's 91st annual meeting (2009) Washington, USA. Poster
- C3. Picard-Hagen N., Gayrard V., Zalko D., Belkouri M., Antignac JP, Toutain PL., Viguié C. Evaluation of polybromodiphenyl ether-induced thyroid disruption in a TBG-expressing species. ENDO2009 The Endocrine Society's 91st annual meeting (2009) Washington, USA. Poster



<b>Paramètres pharmacocinétiques de la totale (moy ± ET)</b>	contrôle	DécaBDE	PentaBDE
Clairance plasmatique (mL/min/kg)	0.025 ± 0.005	0.028 ± 0.009	0.030 ± 0.016
Volume de distribution à l'équilibre (L/kg)	0.100 ± 0.013	0.104 ± 0.018	0.084 ± 0.041
Temps moyen de résidence (h)	66.1 ± 8.5	64.1 ± 10.2	42.4 ± 19.8
Temps de demi-vie d'élimination (h)	48.1 ± 5.9	47.4 ± 8.0	38.0 ± 6.7
<b>Paramètres pharmacocinétiques de la libre (moy ± ET)</b>			
Clairance plasmatique (mL/min/kg)	199 ± 67	201 ± 71	202 ± 104
Volume de distribution à l'équilibre (L/kg)	628 ± 119	601 ± 165	442 ± 175
Temps moyen de résidence (h)	54.2 ± 6.8 <sup>a</sup>	50.7 ± 4.0 <sup>a</sup>	30.9 ± 15.8 <sup>b</sup>
Temps de demi-vie d'élimination (h)	42.0 ± 4.7 <sup>a</sup>	38.9 ± 3.2 <sup>a</sup>	31.3 ± 4.0 <sup>b</sup>
<b>Paramètres de liaison de la T3 protéines de transport (moy ± ET)</b>	contrôle	DécaBDE	PentaBDE
Kd TBG (ng/mL)	0.556 ± 0.191	0.781 ± 0.263	0.896 ± 0.221
Liaison maximale TBG (ng/mL)	120 ± 32	119 ± 38	126 ± 50
NS (constante de liaison non spécifique de la T3 à la TTR et à l'albumine)	135 ± 7	137 ± 24	148 ± 16

Sur une même ligne, les valeurs avec différents exposants (a, b) sont significativement différentes.

**Tab.4 :** Tableau récapitulatif des effets d'une exposition faible (100ng/kg/j iv) à deux classes de PBDE sur les paramètres pharmacocinétiques de la thyroxine chez la brebis thyroïdectomisée traitée à la T3.

- C4. Leghait J., Gayrard V., Picard-Hagen N., Péliissié E., Puel S, Toutain P-L., Viguié C Evaluation of Fipronil-induced thyroid disruption in a TBG-expressing species., *ENDO2008 The Endocrine Society's 90th annual meeting (2008)* San Francisco, USA. Poster
- C5. Viguié C., Leghait J., Gayrard V., Picard-Hagen N , Toutain P-L. A physiologically-based PK/PD model to evaluate the potency of potential thyroid disruptor to alter pituitary TSH secretion., *ENDO2008 The Endocrine Society's 90th annual meeting (2008)* San Francisco, USA. Poster
- C6. Leghait, V. Gayrard, N. Picard-Hagen, N. Cochard, P-L. Toutain, C Viguié. Relevance or irrelevance of the rat model for the toxicological evaluation of thyroid disruptors? J. *Proceedings of the 10<sup>th</sup> International Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology. Turin Italy, September 2006.* Effets thyroïdiens du fipronil
- C7. F. Hérin, E. Boutet, S. Dulaurent, F. Galatry-Bouju, P. Caron, J.M. Soulat Exposition professionnelle au fipronil et marqueurs de la fonction thyroïdienne Société Française de Toxicologie Clinique. Toulouse, 3 avril 2009
- C8. F. Hérin, E. Boutet, S. Dulaurent, F. Galatry-Bouju, P. Caron, J.M. Soulat Exposition professionnelle au fipronil et marqueurs de la fonction thyroïdienne Congrès National De Médecine et Santé au Travail Toulouse, 1-4 juin 2010
- C9. F. Hérin, E. Boutet, S. Dulaurent, F. Galatry-Bouju, P. Caron, J.M. Soulat Société Française d'Endocrinologie Nice, 7-10 octobre 2009

### III -2. *Articles de recherches*

- Leghait J, Gayrard V, Picard-Hagen N, Camp M, Perdu E, Toutain PL, Viguié C. Fipronil-induced disruption of thyroid function in rats is mediated by increased total and free thyroxine clearances concomitantly to increased activity of hepatic enzymes. *Toxicology*. **2009** Jan 8;255(1-2):38-44.
- Julien Leghait, Véronique Gayrard, Pierre-Louis Toutain, Nicole Picard-Hagen, Catherine Viguié Is the mechanisms of fipronil-induced thyroid disruption specific of the rat: re-evaluation of fipronil thyroid toxicity in sheep? *Accepté pour publication dans Toxicology Letters* (janvier 2010)
- Cyril vidau, Ph.D; Jean-Luc Brunet, Dr; Alexandra Badiou, Dr; Luc P. Belzunces, Phenylpyrazole insecticides induce cytotoxicity by altering mechanisms involved in cellular energy supply in the human epithelial cell model Caco-2. *Toxicology in vitro*. 2009 23(4)
- Anne Riu, Jean-Pierre Cravedi, Laurent Debrauwer, Aurélie Garcia, Cécile Canlet, Isabelle Jouanin, Daniel Zalko. Disposition and metabolic profiling of [14C]-Decabromodiphenyl ether in pregnant Wistar rats. *Environment International* 34 (2008) 318–329
- Bichon E, Richard CA, Le Bizec B.. Development and validation of a method for fipronil residue determination in ovine plasma using 96-well plate solid-phase extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2008 Aug 1;1201(1):91-9. Jun 21.

L'ensemble du travail réalisé dans ce projet fait l'objet de plusieurs autres publications en cours de rédaction.

### **III -3. Mémoires**

#### Doctorat d'Université (SEVAB) :

Julien Leghait : Evaluation du potentiel perturbateur thyroïdien du fipronil chez deux espèces : le rat et le mouton. Décembre 2008

#### Master 2 recherche

Roques B. Toxicologie comparative d'un insecticide agrovétérinaire, le fipronil, et de son principal métabolite, le fipronil sulfone, par rapport à la fonction thyroïdienne chez le rat. 2009. Master EQSA

Belkouri M. Impact des retardateurs de flamme polybromés sur la fonction thyroïdienne. 2008. Master EQSA.

#### Thèses vétérinaires expérimentales

Pélissié El : Le fipronil, agent de perturbation thyroïdienne? Exposition et réévaluation de sa toxicité thyroïdienne dans l'espèce ovine modèle pour la régulation thyroïdienne de l'homme. *Thèse de Doctorat Vétérinaire, Université Paul Sabatier Toulouse, 2009.*

Corrège S : Absence d'effet du fipronil sur la clairance de la thyroxine chez la brebis : hypothèses mécanistiques. *Thèse de Doctorat Vétérinaire, Université Paul Sabatier Toulouse, 2009.*

Rauzet N. Evaluation de l'altération de la fonction thyroïdienne par les polybromodiphényléthers chez le mouton. *Thèse de Doctorat Vétérinaire, Université Paul Sabatier Toulouse, 2009.*

#### Stages de M1

M. Menai. Approche de criblage génomique pour l'étude des effets d'un insecticide agrovétérinaire sur la fonction thyroïdienne : contribution à l'analyse des données de puces pangénomiques et confirmation des données par PCR quantitative. Master

Elmegerhi S. Effect of Phenobarbital on antipyrine clearance in sheep. Master of Sciences EURAMA

Morgan Gueritault

Emilie Belkaï

## **IV - Références bibliographiques**

- Antignac J.P., et al., Exposure assessment of French women and their newborn to brominated retardants: Determination of tri- to deca-polybromodiphényléthers (PBDE) in maternal adipose tissue, serum, breast milk and cord serum. *Environmental Pollution* 2009;157;164-173.
- Artursson, P., Palm, K., and Luthman, K. (2001). Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev* 46, 27-43.

- Brunet, J. L., Maresca, M., Fantini, J., and Belzunces, L. P. (2004). Human Intestinal Absorption of Imidacloprid with Caco-2 cells as enterocyte model. *Toxicol Appl Pharmacol* 194, 1-9.
- Cerezo, M., Flors, V. V., Legaz, F., and Garcia-Agustin, P. (2000). Characterization of the low affinity transport system for NO<sub>3</sub>(-) uptake by Citrus roots. *Plant Sci* 160, 95-104.
- Curran, P. G. and L. J. DeGroot (1991). "The effect of hepatic enzyme-inducing drugs on thyroid hormones and the thyroid gland." *Endocr Rev* 12(2): 135-50.
- Das, P. C., Cao, Y., Cherrington, N., Hodgson, E., and Rose, R. L. (2006). Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions* 164, 200-214.
- Delie, F., and Rubas, W. (1997). A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advantages and limitations of the Caco-2 model. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 14, 221-286.
- di Masi, A., E. D. Marinis, et al. (2009). "Nuclear receptors CAR and PXR: Molecular, functional, and biomedical aspects." *Mol Aspects Med* 30(5): 297-343.
- Eveillard, A., F. Lasserre, et al. (2009). "Identification of potential mechanisms of toxicity after di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) adult exposure in the liver using a systems biology approach." *Toxicol Appl Pharmacol* 236(3): 282-92.
- Eveillard, A., L. Mselli-Lakhal, et al. (2009). "Di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) activates the constitutive androstane receptor (CAR): a novel signalling pathway sensitive to phthalates." *Biochem Pharmacol* 77(11): 1735-46.
- Honkakoski, P., I. Zelko, et al. (1998). "The nuclear orphan receptor CAR-retinoid X receptor heterodimer activates the phenobarbital-responsive enhancer module of the CYP2B gene." *Mol Cell Biol* 18(10): 5652-8.
- Huang, H., C. D. Fleming, et al. (2005). "Stereoselective hydrolysis of pyrethroid-like fluorescent substrates by human and other mammalian liver carboxylesterases." *Chem Res Toxicol* 18(9): 1371-7.
- Kelly, G. S. (2000). "Peripheral metabolism of thyroid hormones: a review." *Altern Med Rev* 5(4): 306-33.
- Kester, M. H., C. H. van Dijk, et al. (1999). "Sulfation of thyroid hormone by estrogen sulfotransferase." *J Clin Endocrinol Metab* 84(7): 2577-80.
- Le Ferrec, E., Chesne, C., Artusson, P., Brayden, D., Fabre, G., Gires, P., Guillou, F., Rousset, M., Rubas, W., and Scarino, M. L. (2001). In vitro models of the intestinal barrier. The report and recommendations of ECVAM Workshop 46. European Centre for the Validation of Alternative methods. *Altern Lab Anim* 29, 649-668.
- Leghait, J., V. Gayraud, et al. (2009). "Fipronil-induced disruption of thyroid function in rats is mediated by increased total and free thyroxine clearances concomitantly to increased activity of hepatic enzymes." *Toxicology* 255(1-2): 38-44.
- Lemaire, G., W. Mnif, et al. (2006). "Identification of new human pregnane X receptor ligands among pesticides using a stable reporter cell system." *Toxicol Sci* 91(2): 501-9.
- Lesauskaite, V., and Ivanoviene, L. (2002). [Programmed cell death: molecular mechanisms and detection]. *Medicina (Kaunas)* 38, 869-875.
- Maglich, J. M., J. Watson, et al. (2004). "The nuclear receptor CAR is a regulator of thyroid hormone metabolism during caloric restriction." *J Biol Chem* 279(19): 19832-8.
- Mandard, S., M. Muller, et al. (2004). "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes." *Cell Mol Life Sci* 61(4): 393-416.

- Meaney, C., and O'Driscoll, C. (1999). Mucus as a barrier to the permeability of hydrophilic and lipophilic compounds in the absence and presence of sodium taurocholate micellar systems using cell culture models. *Eur J Pharm Sci* 8, 167-175.
- Pinto, M., Robine-Leon, S., Appay, M. D., Kedlinger, M., Triadou, N., Dussaulx, E., Lacroix, B., Simon-Assmann, P., Haffen, K., Fogh, J., and Zweibaum, J. (1981). Enterocyte-like differentiation and polarization in the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell.* 47, 323-330.
- Qatanani, M., J. Zhang, et al. (2005). "Role of the constitutive androstane receptor in xenobiotic-induced thyroid hormone metabolism." *Endocrinology* 146(3): 995-1002.
- Ray, S., and Peters, C. A. (2008). Changes in microbiological metabolism under chemical stress. *Chemosphere* 71, 474-483.
- Savu, L., et al., A senescence up-regulated protein: the rat thyroxine-binding globulin (TBG). *Biochim. Biophys. Acta* 1991;1097;19-22.
- Stok, J. E., H. Huang, et al. (2004). "Identification, expression, and purification of a pyrethroid-hydrolyzing carboxylesterase from mouse liver microsomes." *J Biol Chem* 279(28): 29863-9.
- Tien, E. S., K. Matsui, et al. (2007). "The nuclear receptor constitutively active/androstane receptor regulates type 1 deiodinase and thyroid hormone activity in the regenerating mouse liver." *J Pharmacol Exp Ther* 320(1): 307-13.
- van Waterschoot, R. A., R. W. Rooswinkel, et al. (2009). "Intestinal cytochrome P450 3A plays an important role in the regulation of detoxifying systems in the liver." *Faseb J* 23(1): 224-31.
- Vaughan, P. F., Peers, C., and Walker, J. H. (1995). The use of the human neuroblastoma SH-SY5Y to study the effect of second messengers on noradrenaline release. *Gen Pharmacol* 26, 1191-1201.
- Vidau, C., Brunet, J.-L., Badiou, A., and Belzunces, L. P. (2009). Phenylpyrazole insecticides induce cytotoxicity by altering mechanisms involved in cellular energy supply in the human epithelial cell model Caco-2. *Toxicology in Vitro* 23, 589-597.
- Wang, H., Y. Zhao, et al. (2004). "Cloning, expression, and characterization of three new mouse cytochrome p450 enzymes and partial characterization of their fatty acid oxidation activities." *Mol Pharmacol* 65(5): 1148-58.
- Xu, C., X. Wang, et al. (2009). "Regulation of tissue-specific carboxylesterase expression by pregnane x receptor and constitutive androstane receptor." *Drug Metab Dispos* 37(7): 1539-47.
- Yamashita, S., Furubayashi, T., Kataoka, M., Sakane, T., Sezaki, H., and Tokuda, H. (2000). Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. *Eur J Pharm Sci* 10, 195-204.
- Yee, S. (1997). In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man--fact or myth. *Pharm Res* 14, 763-766.
- Zhou, T., et al., Developmental exposure to brominated diphenyl ethers results in thyroid hormone disruption. *Toxicol. Sci.* 2002;66;105-116.