

Fipronil et retardateurs de flamme polybromés : exposition et altération des fonctions thyroïdienne et corticosurrénalienne

Catherine Viguié¹, Jean-Marc Soulat², Luc belzunces³, Anne Lespine⁴, Pascal Martin⁴, Daniel Zalko⁵, Roger Rahmani⁶,

¹UMR 181 INRA ENVT31076 Toulouse, France – ²Service des maladies Environnementales et professionnelles Hôpitaux de Toulouse, France – ³UMR INRA, UAPV, 84000 Avignon, France – ⁴UR INA 66, 31931 Toulouse, France, ⁵UMR INRA, ENVT 1089, – ⁶: UMR INRA, ENVT 1089, 31931 Toulouse, France

Introduction

L'ensemble des enquêtes épidémiologiques menées à l'échelon mondial montre depuis quelques années une augmentation préoccupante de la fréquence des pathologies potentiellement liées à un dysfonctionnement endocrinien. Parmi ces pathologies, les altérations de la fonction thyroïdienne ont vu leur incidence augmenter de façon importante. La fonction corticotrope (gestion du stress), quant à elle n'est que très rarement évaluée

Une régulation précise de ces deux fonctions est requise pour un développement harmonieux du système nerveux central au cours de l'ontogenèse et pour le maintien de son intégrité chez l'adulte. Une hypothèse actuelle est que l'exposition des mères à des perturbateurs thyroïdiens ou corticosurrénaux pendant la grossesse pourrait être associée à des troubles ultérieurs du développement intellectuel et/ou cognitif chez l'enfant.

Le fipronil un insecticide agrovétérinaire très répandu a été identifié par les études toxicologiques comme un perturbateur potentiel de la fonction thyroïdienne

Les retardateurs de prise de feu de la famille des poly-bromo-diphényle éthers (PBDE) sont des produits chimiques incorporés dans les matières plastiques et dans la production de mousses et matériaux de capitonnage dans le but de leur conférer des propriétés ignifuges. Leur production mondiale est en constante augmentation. Depuis le 15 août 2004, seul le Decabromodiphényl ether est autorisé au sein de l'UE. (Décision 76/769/EEC). L'implication des PBDE ou de leurs métabolites en tant que dérégulateurs endocriniens apparaît probable, notamment à cause de leur affinité importante pour les protéines de transport des hormones thyroïdiennes.

Le programme de recherche proposé avait pour ambition d'établir un schéma intégratif aussi complet que possible de l'exposition et du mode d'action de deux types de composés sur les fonctions thyroïdienne et corticotrope .

Méthodologie

I. Evaluation de l'exposition

1. *Evaluation comparative des paramètres pharmacocinétiques (PK) du fipronil dans différents modèles animaux :*

Modélisation de l'évolution des concentrations plasmatiques en toxique au cours du temps suite à une administration unique

2. *Evaluation quantitative et qualitative de l'exposition au fipronil chez l'homme*

Etude ergotoxicologique en milieu professionnel : usine de conditionnement de fipronil. Caractérisation de la relation entre l'exposition interne en fipronil et son métabolite sulfone et les concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes et TSH.

II. Mécanismes de l'exposition: passage de la barrière digestive, transport et pénétration cellulaire

1. Caractérisation du passage de la barrière digestive sur des lignées cellulaires humaines :

Etude du passage et de la métabolisation du fipronil et de sa cytotoxicité sur monocouche de cellules caco 2 polarisées.

2. Interaction avec des transporteurs pompes à efflux Effet des toxiques (dose/réponse) sur l'accumulation intracellulaire de substrats spécifiques des transporteurs Pgp, BCRP et MDR sur des cultures de cellules surexprimant ces transporteurs.

III. Modulation de l'exposition : devenir métabolique

1. Evaluation qualitative de l'exposition dans des modèles animaux lors de contamination par voie orale

Caractérisation des profils plasmatiques et urinaires en fipronil et ses métabolites suite à l'administration de fipronil marqué.

2. Etudes métaboliques in vitro

Caractérisation des profils intra et extracellulaires en fipronil et ses métabolites sur hépatocytes humains en culture primaire

3 Métabolisme hépatique

Cytotoxicité hépatique du fipronil et des ses principaux métabolites (dose/réponse) surhépatocytes en culture primaires, approche multiespèce.

Profils d'induction enzymatique sur hépatocytes humains en culture
Effets du fipronil sur le transcriptôme hépatocytaire (hépatocytes humains et murins)

IV. Marqueurs d'exposition, marqueurs d'effets au niveau hépatique

Effet d'un traitement au fipronil sur le transcriptôme hépatique d'animaux traités: puces pangénomiques et/ou puces dédiées récepteurs nucléaires

V. Effets physiopathologiques sur les systèmes endocriniens

1. Approche descriptive : caractérisation des effets sur les axes thyroïdiens et corticotrope in vivo

Effet d'un traitement au fipronil sur les profils en hormones thyroïdiennes, TSH et cortisol plasmatiques chez le rat (référence en toxicologie) et l'ovine (référence pour le schéma de régulation de la fonction thyroïdienne).

2. Approche mécanistique : détermination du niveau d'interaction avec les axes hypothalamo-hypophyso thyroïdien

- Effet d'un traitement au fipronil sur le métabolisme des hormones thyroïdiennes (rat et ovin) : détermination de la clairance plasmatique de la thyroxine (T4) sur un modèle d'animaux dépourvus de thyroxine endogène.
- *Effets directs sur la glande thyroïde* : transcriptôme de la glande thyroïde (puce pangénomique)
- *Effets potentiels sur le système nerveux central* : Approche *in vitro* : cytotoxicité sur cultures neuronales à phénotype dopaminergique (lignée SH-SY5Y)

Résultats/Discussion

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 induisant une augmentation de la clairance de la thyroxine (T4). 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.

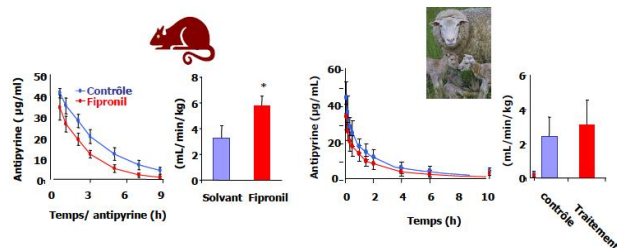


Figure 1 : Effets d'un traitement au fipronil par voie orale chez la rate (3mg/kg/j) et la brebis (5 mg/kg tous les 4 jours) sur la clairance de la thyroxine totale.

Chez l'ovine, les effets du fipronil sont beaucoup moins marqués et ne se traduisent pas par des altérations des profils hormonaux. Cette divergence entre les deux espèces pourrait être expliquée par des différences dans les voies métaboliques du fipronil conduisant à des schémas d'exposition différents (exposition

au sulfone beaucoup plus importante chez le rat). Les résultats obtenus sur hépatocytes indiquent en effet des différences quantitatives dans les principales voies métaboliques entre espèces comme le suggère le profils de métabolites obtenus sur culture d'hépatocytes de différentes espèces dont l'homme (Fig. 2).

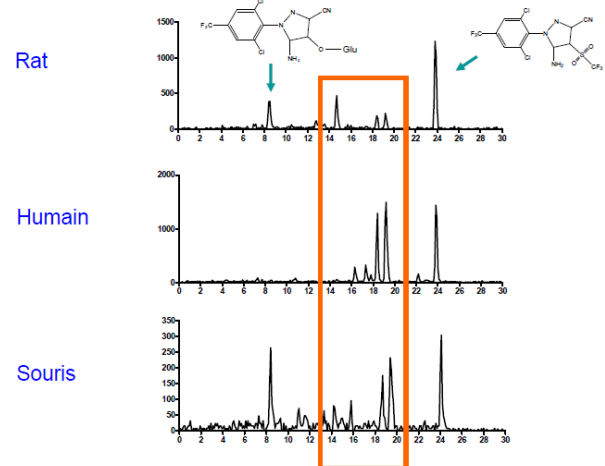


Figure 2 : Radiochromatogramme du fipronil et de ses métabolites après incubation d'hépatocytes de rat d'homme et de souris.

Nos expérimentations de criblage génomique sur foie d'animaux traités (Fig. 3A) et sur hépatocytes en culture (Fig. 3B) suggèrent l'implication probable de récepteurs nucléaires aux xénobiotiques dans les mécanismes conduisant à une augmentation du métabolisme hépatique. Cette implication de récepteurs nucléaires est un des facteurs pouvant contribuer à des différences interspécifiques importantes dans les effets du fipronil sur la fonction thyroïdienne.

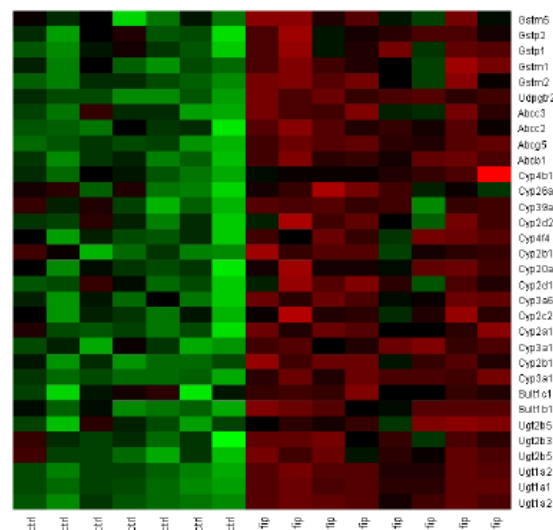


Figure 3A : Régulation de gènes du métabolisme hépatique des xénobiotique dans le foie d'animaux contrôles (ctrl) ou traités au fipronil (fip).

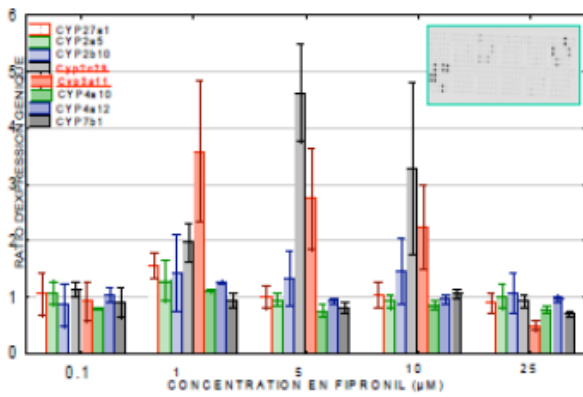


Figure 3B : Effets d'une exposition au fipronil sur l'expression de gènes codants pour différents enzymes cytochromes hépatiques sur des cultures d'hépatocytes humains.

Le travail réalisé sur lignées neuronales suggère que le fipronil pourrait agir au niveau du système nerveux central par des mécanismes de stimulation de l'apoptose. 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 milieu professionnel (Fig.4).

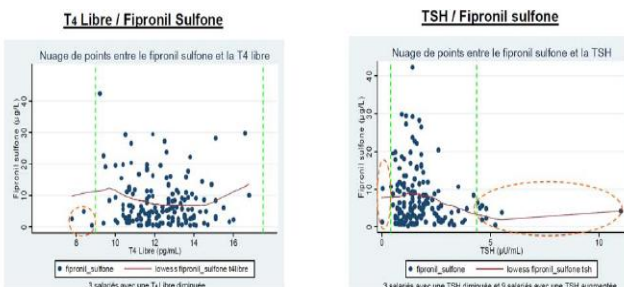


Figure 4 : Concentrations plasmatiques en fipronil sulfone en fonction de deux paramètres usuels d'évaluation de la fonction thyroïdienne : Thyroxine libre et TSH, dans une population de travailleurs potentiellement exposés au fipronil . Ces résultats ne supportent pas l'hypothèse d'un effet inhibiteur d'une faible exposition chronique (4 ans en moyenne) au fipronil/fipronil sulfone sur la fonction thyroïdienne chez l'homme sain.

Du point de vue du transport du fipronil, nos résultats indiquent que son absorption à travers la barrière intestinale serait très efficace et procéderait de mécanismes passifs et actifs. Nos résultats sur lignée cellulaire transfectées désignent le transporteur BCRP, dont l'action est inhibée par le fipronil et son métabolite sulfone à faible dose, comme transporteur potentiel du fipronil.

L'approche génomique mise en place sur la thyroïde souligne l'importance du potentiel de compensation de la thyroïde face à un agent perturbant le métabolisme de ses hormones.

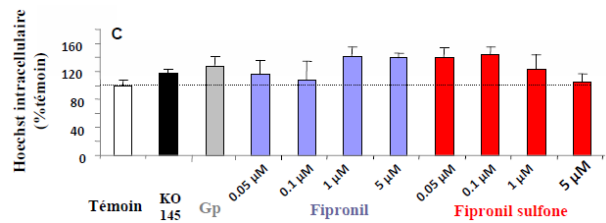


Figure 5 : Effet du fipronil et de son métabolite sulfone sur l'accumulation intracellulaire d'un substrat spécifique des BCRP (Hoechst) .L'augmentation de la concentration intracellulaire du substrat indique une inhibition du transporteur par le fipronil et son métabolite à faibles doses.

Quant aux 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 et à faible dose, d'effets importants sur la fonction thyroïdienne dans un modèle ovin.

En revanche, le mélange contenant des composés moins bromés (PBDE) à très faible dose (100ng/kg/j) diminue le temps de demi-vie de la thyroxine sous sa forme libre.

Temps de demi-vie de la T4 libre

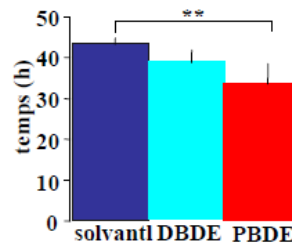


Figure 6 : Effets du decabromodiphényl ether pur (PBDE 100 ng/kg/j iv x 28 jours) et d'un mélange contenant des dérivés faiblement bromés (pentamix : PBDE 100 ng/kg/j) sur le temps de demi-vie de la thyroxine libre chez la brebis.

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, la TBG. Nos résultats suggèrent que les dérivés faiblement bromés (PBDE) pourraient interagir avec cette protéine induisant des modifications subtiles du comportement pharmacocinétiques de la forme libre des hormones dont une diminution du temps de demi-vie (fig.6).

Ni le fipronil, ni les PBDE n'ont entraîné de modifications des taux de cortisol circulant.

Conclusion

Ce travail souligne la place centrale du métabolisme hépatique comme cible de perturbateurs thyroïdiens et met en exergue tout le poids des différences interspécifiques dans l'interprétation des résultats des évaluations toxicologiques.