Pesticides : données récentes sur l'exposition et les risques dans un contexte français

Réseau d'échange sur les enjeux en santé environnementale, 18 mars 2014

Nathalie Bonvallot, toxicologie et santé publique

Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique

UMR 1085 INSERM IRSET, Rennes, France

Objectifs de la présentation

- Connaître le contexte français lié à l'usage des **pesticides**;
- Connaître les **études mise en œuvre en vue d'évaluer les expositions environnementales**, incluant l'alimentation;
- Mise à jour des **données scientifiques sur les effets sanitaires liés à l'exposition aux pesticides**;
- **Connaître les nouvelles données publiées sur l'intérêt potentiel des outils « omics » (spécifiquement la métabolomique) pour comprendre les relations exposition/ risque**

Définition des pesticides

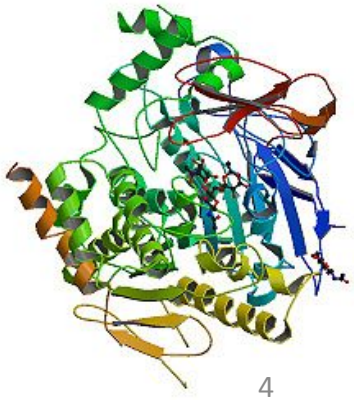
- Pesticides = produits formulés par l'homme destinés à détruire ou repousser les espèces indésirables de plantes ou d'animaux causant des dommages sur les cultures ou utilisés comme régulateur de croissance, défoliant ou dessicant

- Ils font l'objet de 4 réglementations européennes distinctes pour leur mise sur le marché
  - Règlements (CE) n° 1107/2009 pour les phytosanitaires et n°528/2012 pour les biocides
  - Directives 2004/27 et 2004/28 CE pour les antiparasitaires à usage humain et vétérinaire

Classifications des pesticides

- Par usages :
  - Herbicides
  - Fongicides
  - Insecticides…

- Par famille chimique (mode d'action)
  - Insecticides organophosphorés, pyréthrinoïdes
  - Fongicides morpholines, strobilurines
  - Herbicides chloroacétamides, thiocarbamates…

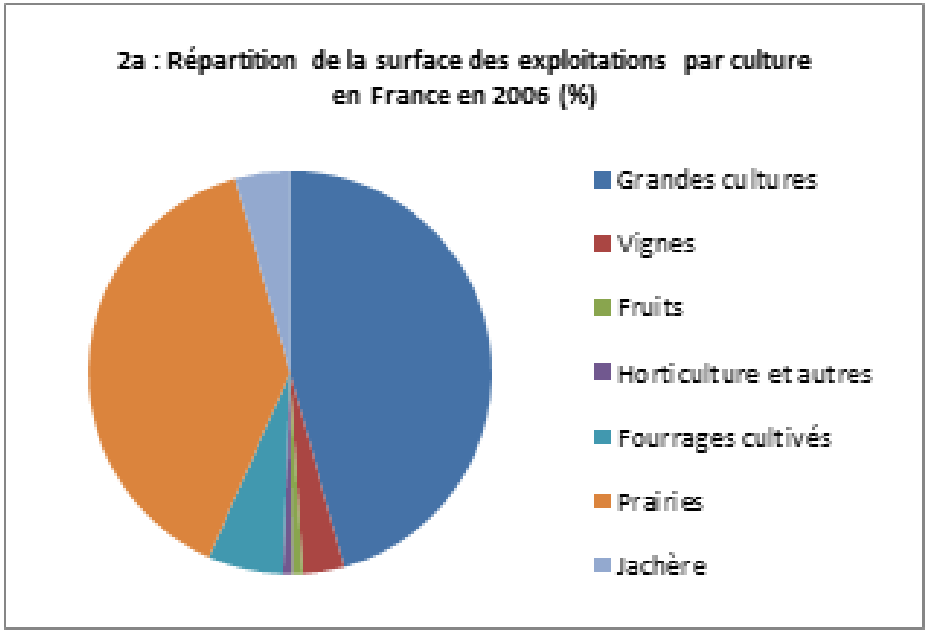


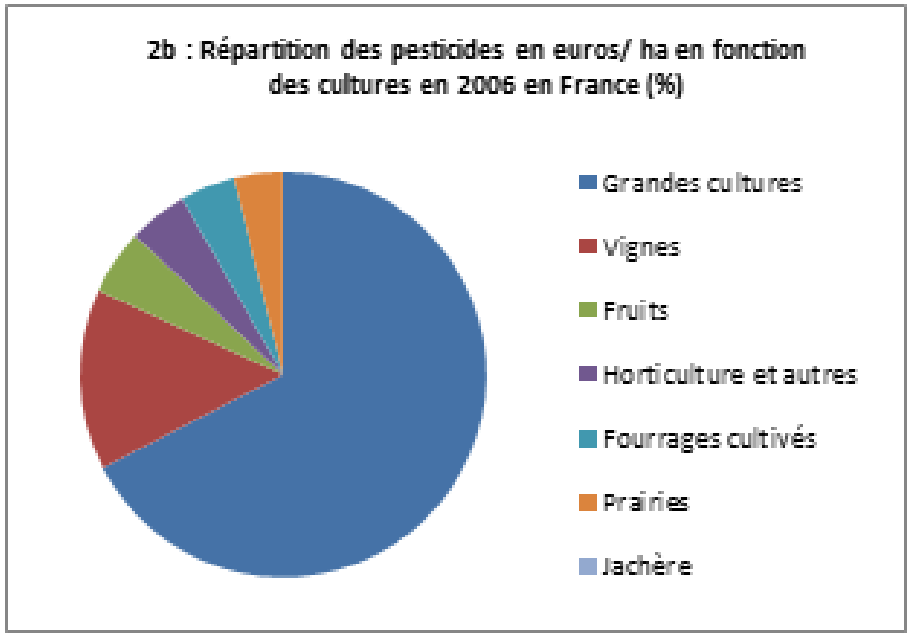
Les pesticides en France

- La France est l'un des premiers utilisateurs mondiaux de pesticides :
- 80 000 tonnes par an
- 309 substances actives commercialisées en 2012
- 46% de fongicides, 33% d'herbicides et >5% d'insecticides

Sources : INSERM, 2013, Expertise collective pesticides et santé ; Ministère de l'Agriculture, http://www.developpement-durable.gouv.fr

Les pesticides en France





Répartition de la surface des exploitations par culture et de l'usage des pesticides (euros/ha) en France en 2006 (%)

Source : Butault et al. L'utilisation des pesticides en France : état des lieux et perspectives de réduction, 2011. Ministère de l'agriculture.

Une préoccupation de santé publique

- Effets sanitaires documentés en situation professionnelle :
  - Cancers (lymphome non Hodgkinien, myélome multiple…)
  - Maladies neurodégénératives
  - Troubles cognitifs (INSERM, 2013)

- Femme enceinte et fœtus vulnérables

- En population générale, prévalence de l'exposition mal connue mais potentiellement importante, quels effets?

Les récentes données sus les expositions françaises aux pesticides

- Les travaux du groupe d'étude rattaché au comité d'orientation et de prospective scientifique de l'ORP* ont montré des lacunes dans les connaissances (usages, quantités, contaminations, expositions)

- Les enquêtes « Alimentation Totale » (EAT) réalisées régulièrement par l'ANSES* donnent des informations mises à jour sur les estimations des expositions alimentaires

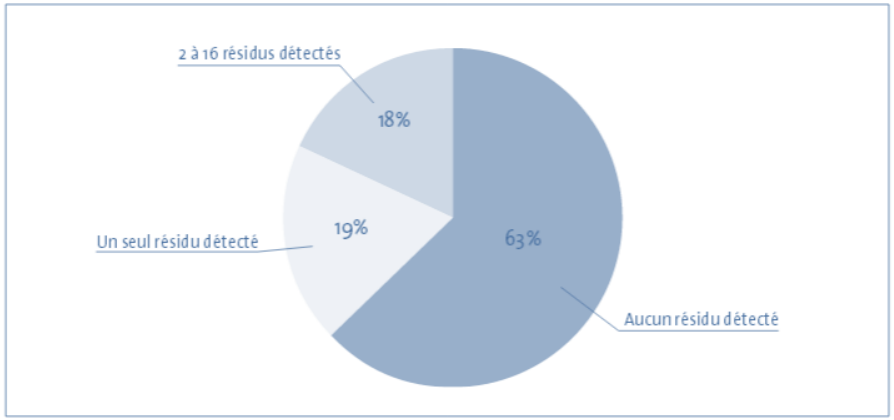
- Le volet environnemental de l'enquête nationale nutrition santé (ENNS) réalisée par l'InVS* en 2006-2007 fait état d'une particularité française qui reste à étudier

*ORP : Observatoire des résidus de pesticides, travaux relatifs à l'exposition de la population générale aux pesticides en France, 2010; ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire alimentation, environnement, travail; InVS : Institut de veille sanitaire, 2013

EAT 2, ANSES, juin 2011

- 283 substances actives recherchées dans 194 types d'aliments (≈ 20 000 denrées couvrant 90% de la consommation alimentaire) achetés entre 2007 et 2009 → 146 000 analyses
- 210 pesticides (74%) non détectés, 73 pesticides détectés

Figure 1 : Pourcentage d'échantillons composites avec résidu détecté (toutes substances)



- Estimation des expositions basées sur les données de consommation alimentaire française

Pesticides les plus fréquemment retrouvés

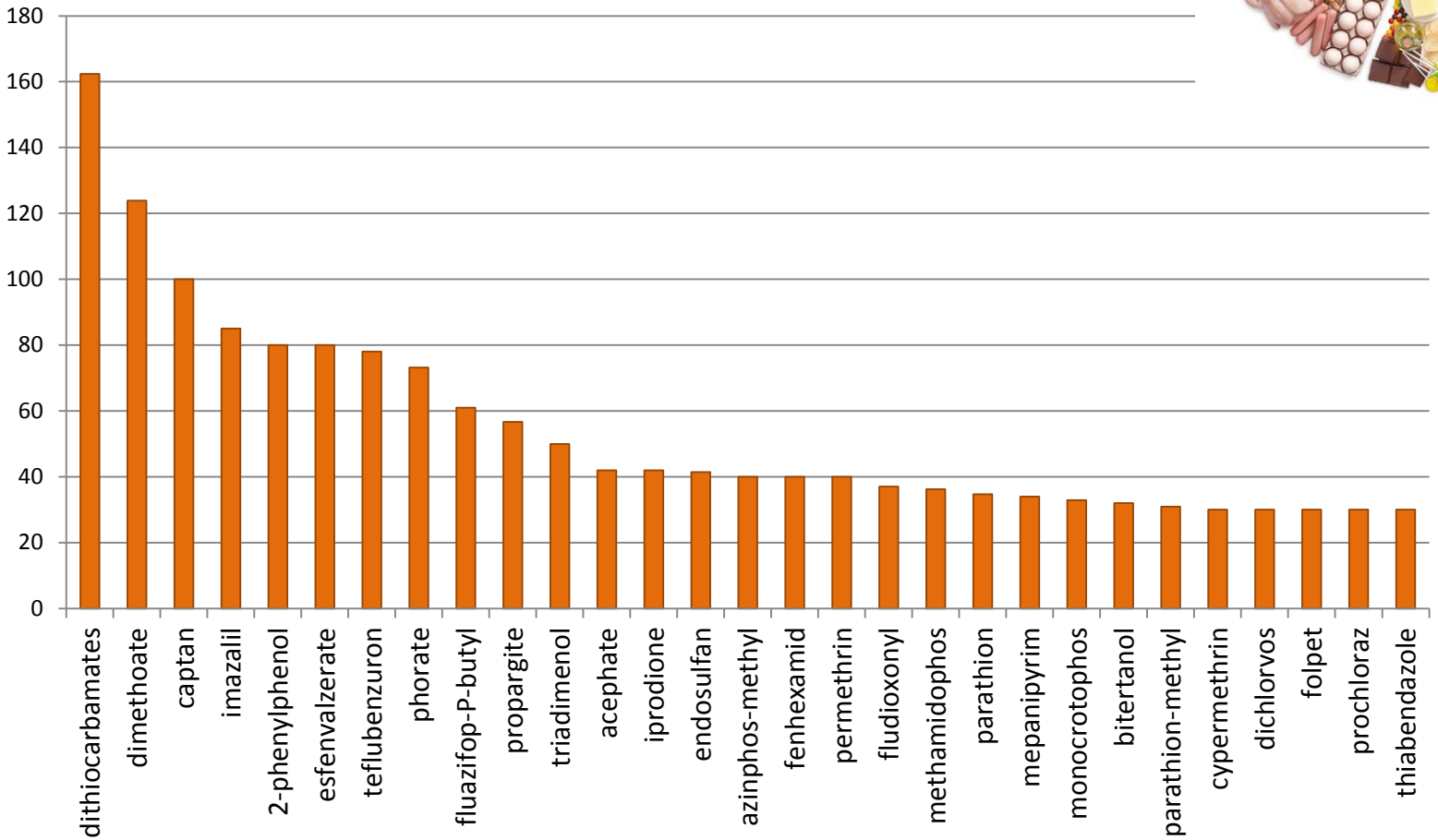
Tableau 3 : Substances actives prioritaires dont la fréquence de détection est supérieure à 1 %

Substance actives prioritaires	Type	Nb échantillons composites analysés	% échantillons avec résidu(s) détecté(s)	% échantillons avec résidu(s) quantifié(s)	Nb aliments différents avec résidu(s) détecté(s)	Groupes d'aliments avec résidu(s) détecté(s)
Pyrimiphos-méthyl	I	1235	7,2	5,3	45	Céréales, produits à base de blé, riz, légumes, soupes
Iprodione	F	1235	3,9	3,7	14	Fruits et légumes, vin, hamburger
Chlorpyriphos-éthyl	I	1235	3,4	1,1	11	Fruits et légumes, merguez
Chlorpyriphos-méthyl	I	1235	2,3	0,9	17	Céréales, fruits et légumes, produits à base de blé, riz
Carbendazime	F	1143	1,3	0,7	5	Fruits, eaux
Imazalil	F	1072	1,1	0,7	10	Fruits et jus de fruits, pommes de terre

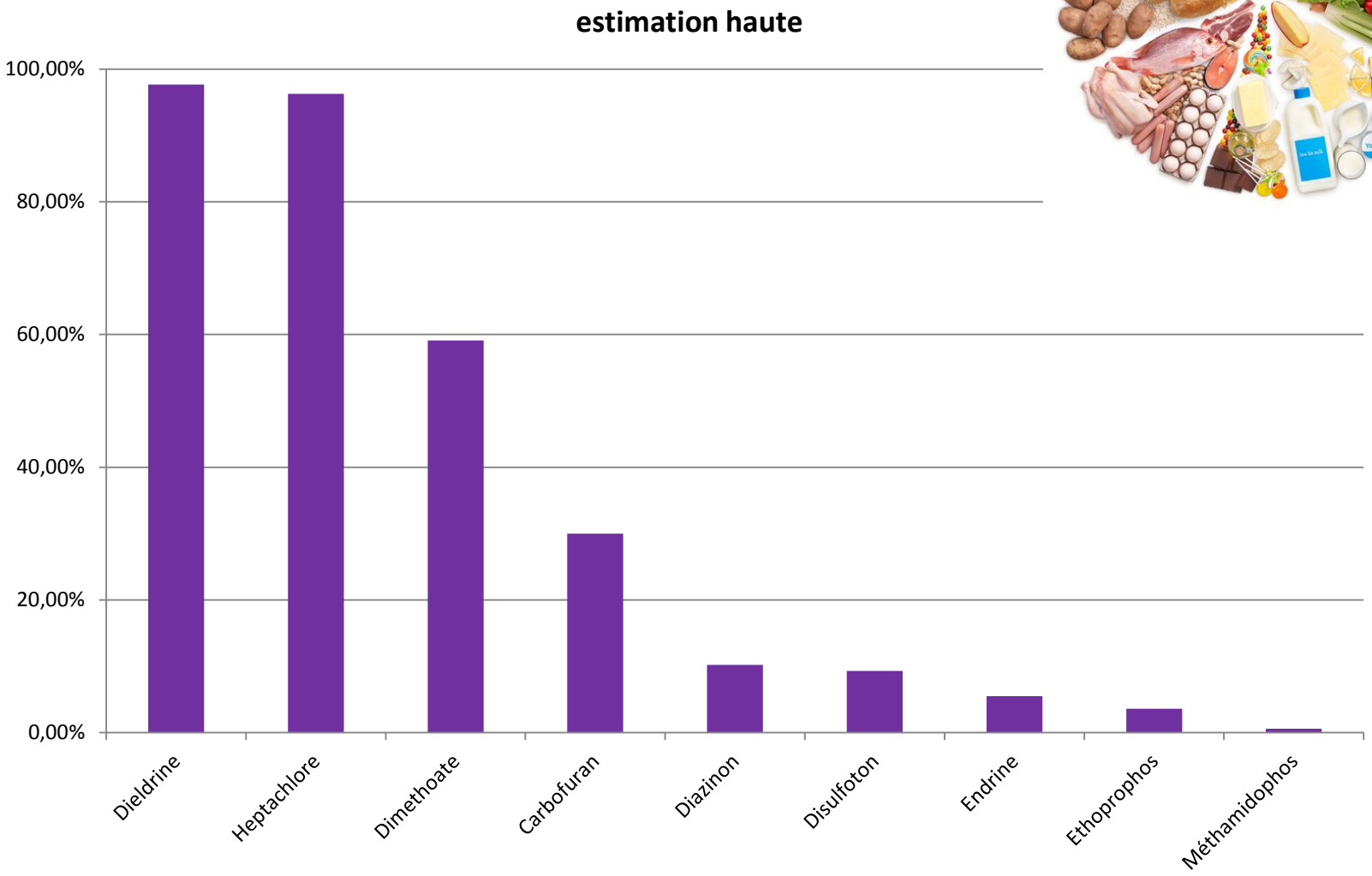
I : insecticide, F : fongicide

Source : ANSES, EAT2, 2011.
http://www.anses.fr/fr/content/les-%C3%A9tudes-de-lalimentation-totale-eat

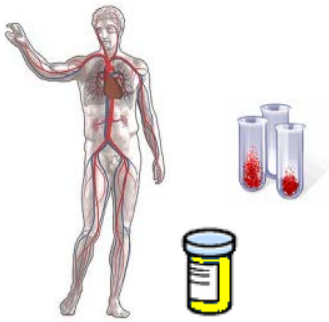
Estimation des expositions alimentaires françaises (ng/kg/j)



Pourcentage de la population avec exposition estimée > DJA

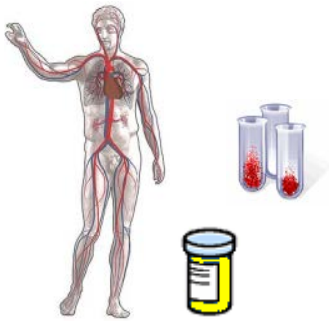


Etude de biosurveillance, InVS, 2007



- Territoire métropolitain
- Adultes et enfants > 3 ans représentatifs de la population française
- Mesure des pesticides organochlorés, organophosphorés et pyréthrinoïdes sang/ urine
- Permet de dresser un 1er état des lieux de l'imprégnation de la population française aux pesticides

La particularité française



- Des concentrations élevées retrouvées dans les urines de la population française (par rapport aux études américaines, canadiennes ou allemandes) pour :
  - **2,4- et 2,5-dichlorophénols** (métabolites de pesticides, usages plus anciens désodorisant ou anti-mites)
  - Dialkylphosphates (dérivés diméthylés et diéthylés), métabolites des pesticides **organophosphorés**
  - Tous les métabolites des **pyréthrinoïdes** (usages au domicile? agriculture? Expositions alimentaires ou environnementales locales?)

Exemple des pyréthrinoïdes

Tableau 100 - Distribution des concentrations urinaires de 3-PBA (µg/g de créatinine) dans la population adulte française - ENNS 2006/7										
				Percentiles						
	n	**MG**	IC MG	10	25	50	75	90	**95**	IC P95
Total (18-74 ans)	396	**0,72**	**[0,64 ; 0,81]**	0,24	0,38	0,63	1,40	2,14	**3,48**	[2,42 ; 5,70]
Genre										
Femmes	139	**0,83**	[0,69 ; 0,99]	0,27	0,47	0,68	1,64	2,63	5,43	[2,67 ; 5,96]
Hommes	257	**0,63**	[0,54 ; 0,73]	0,22	0,31	0,61	1,12	1,88	2,43	[1,90 ; 3,28]
Âge (ans)										
18 à 39	123	**0,70**	[0,60 ; 0,83]	0,23	0,35	0,62	1,49	1,96	3,45	[2,02 ; 5,09]
40 à 59	191	**0,77**	[0,65 ; 0,91]	0,25	0,44	0,69	1,37	2,38	3,41	[2,22 ; 5,75]
60 à 74	82	**0,67**	[0,48 ; 0,95]	0,22	0,36	0,60	1,07	2,05	3,73	[1,67 ; 5,96]

n : effectif dans l'échantillon ENNS initial ; MG : moyenne géométrique ; IC : intervalle de confiance

Source : InVS, 2013.
http://www.invs.sante.fr/Publications-et-outils/Rapports-et-syntheses/Environnement-et-sante/2013/Exposition-de-la-population-francaise-aux-substances-chimiques-de-l-environnement-Tome-2-Polychlorobiphenyles-PCB-NDL-Pesticides

Les expositions françaises aux pesticides

- Nombreuses données d'exposition alimentaire, mais exposition environnementale peu connue

- Résultats de l'enquête ENNS interroge sur le rôle de ces expositions dans l'imprégnation de la population (*cf. pyréthrinoïdes*)

- Lien entre proximité d'usage des pesticides et exposition largement évoqué dans la littérature

Les déterminants étudiés des expositions environnementales locales

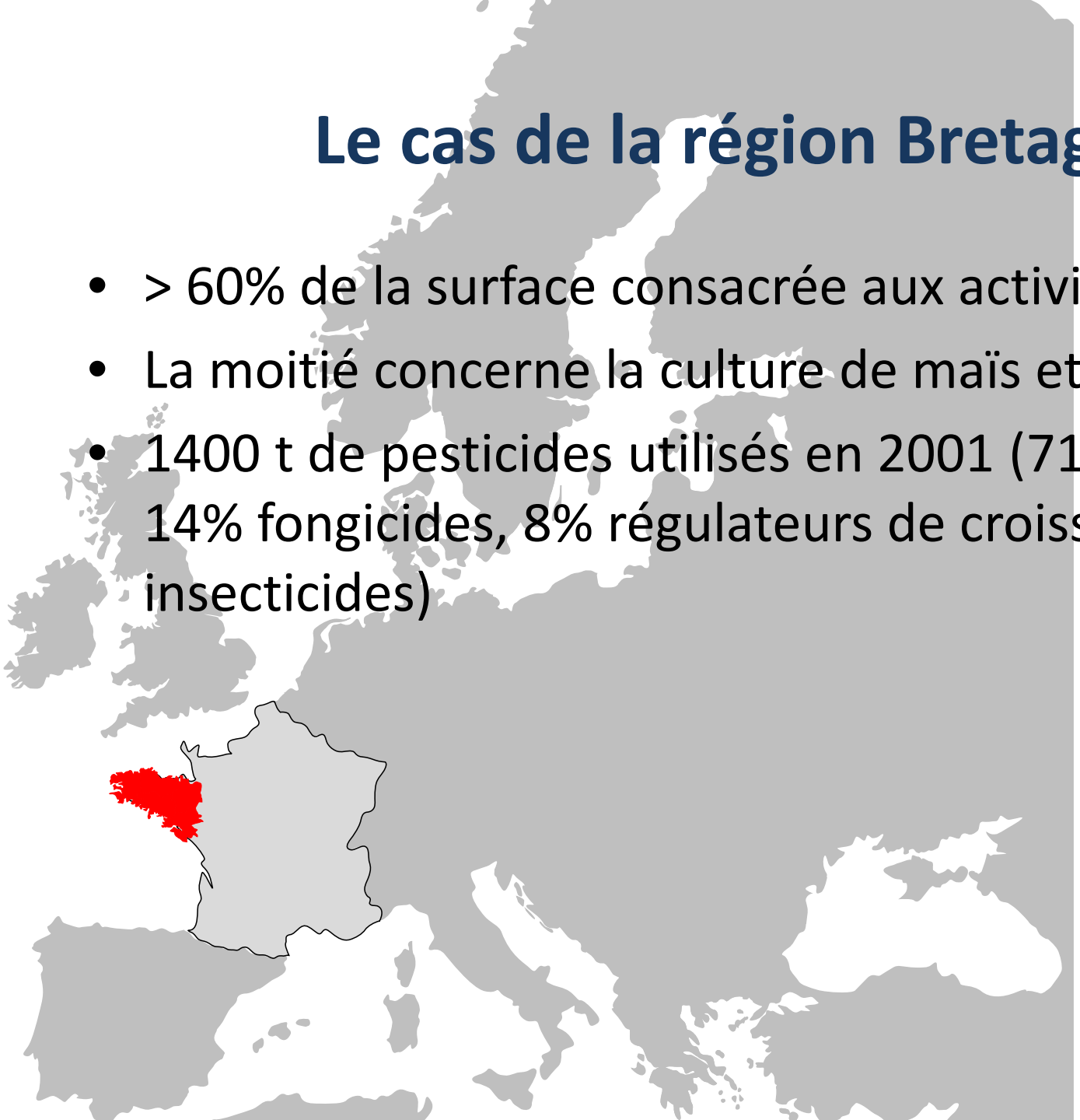
Vivre en milieu rural (organophosphorés, chloroacétamides) *(Munoz-Quezada et al. 2012, Chevrier et al. 2014)*

Distance au champ (60 à 1250 m) (organophosphorés, diméthylchlorthal, iprodione, phosmet, chloroacétamides, triazines) *(Gunier et al. 2011, Bradman et al. 2011, Chevrier et al. 2014)*

Surface dédiée à la culture dans la commune de résidence (fongicides) *(Jamin et al. 2014)*

Le cas de la région Bretagne

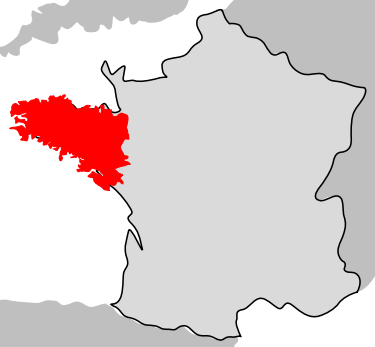
- > 60% de la surface consacrée aux activités agricoles
- La moitié concerne la culture de maïs et de céréales
- 1400 t de pesticides utilisés en 2001 (71% herbicides, 14% fongicides, 8% régulateurs de croissance, 7% insecticides)

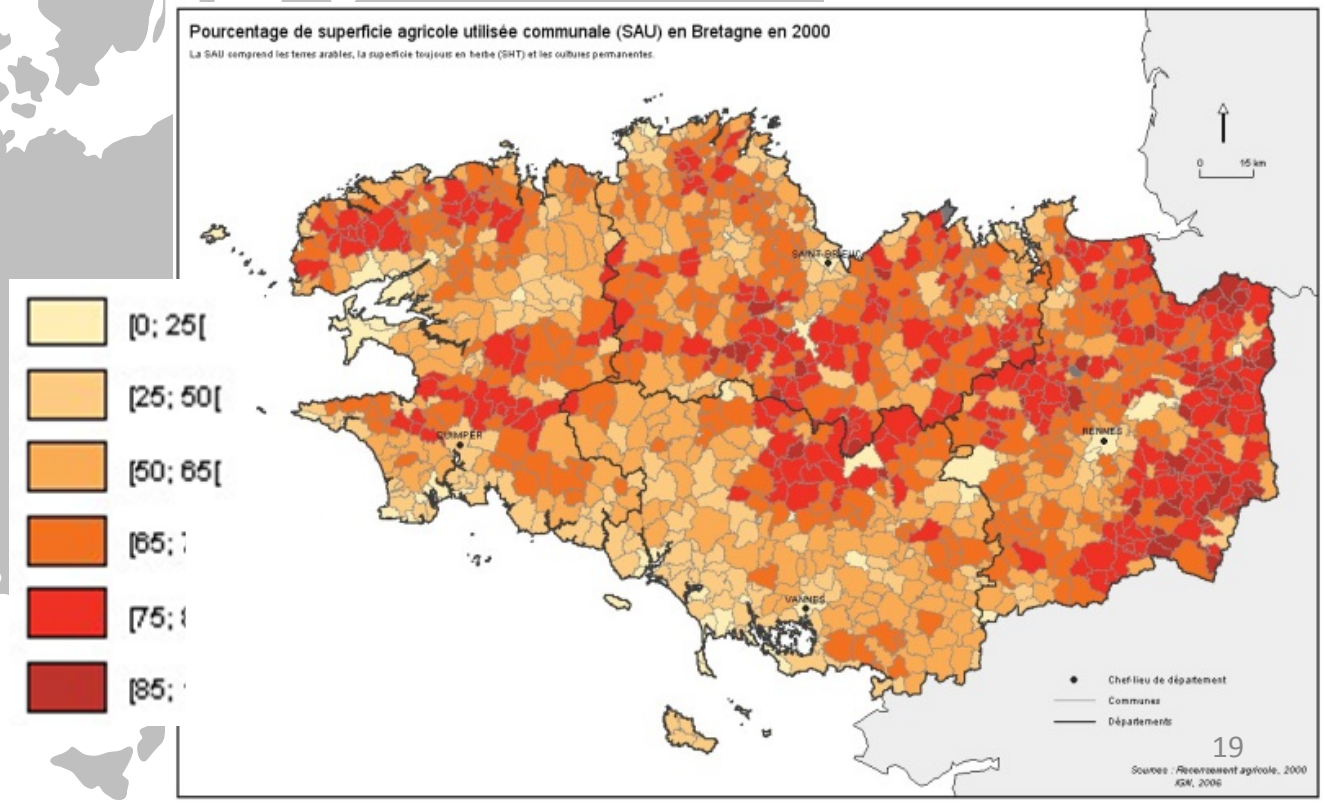


Le cas de la région Bretagne

Représentation géographique des surfaces agricoles en Bretagne en 2000

Source : Recensement Agricole 2000; IGN BdCartho ; cartes réalisées par Tania Serrano-Chavez, INSERM U1085, décembre 2013





Le cas de la région Bretagne

- 2001-2004 : nombreuses molécules utilisées, presque toutes les surfaces cultivées recevaient au moins 4 traitements ≠

Herbicides du maïs	Isoproturon, bromoxynil, sulcotrione, diflufénicanil, ioxynil, nicosulfuron, phenmédiphame, clomazone, alachlore, acétochlore, prochloraz, S-métolachlore, glyphosate
Fongicides du blé (sur 100% des parcelles)	Epoxiconazole, krésoxym-méthyle, asoxystrobine, tébuconazole, procymidone, cyprodinil, fenpropimorphe
Régulateurs de croissance du blé (48% des surfaces traitées)	Chlorméquat, étéphon
Insecticides du maïs	Carbofuran, carbosulfan, benfuracarbe, imidaclopride

Sources : CORPEP, enquêtes sur l'utilisation des produits phytosanitaires utilisés sur culture de blé, maïs et colza en 2001 et 2005; ACTA, index phytosanitaire 2004; Air Breizh, cadastre des émissions atmosphériques en Bretagne, 2003

Le cas de la région Bretagne

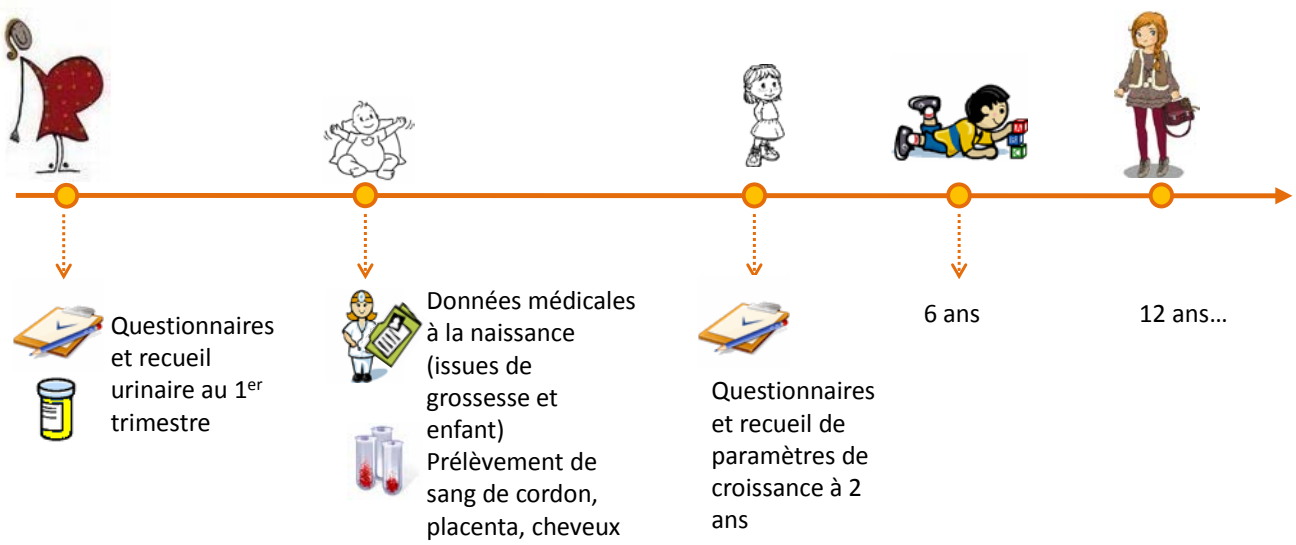
- **Près de 90 % des usages sur grandes cultures**

Herbicides du maïs	Isoproturon, **bromoxynil**, sulcotrione, diflufénicanil, ioxynil, nicosulfuron, phenmédiphame, clomazone, alachlore, **acétochlore**, prochloraz, S-métolachlore, **glyphosate**
Fongicides du blé (sur 100% des parcelles)	Epoxiconazole, krésoxym-méthyle, asoxystrobine, tébuconazole, procymidone, cyprodinil, **fenpropimorphe**
Régulateurs de croissance du blé (48% des surfaces traitées)	**Chlorméquat, étéphon**
Insecticides du maïs	**Carbofuran**, carbosulfan, benfuracarbe, **imidaclopride**

Sources : CORPEP, enquêtes sur l'utilisation des produits phytosanitaires utilisés sur culture de blé, maïs et colza en 2001 et 2005; ACTA, index phytosanitaire 2004; Air Breizh, cadastre des émissions atmosphériques en Bretagne, 2003

La cohorte PELAGIE
(Dr. S. Cordier et C. Chevrier)

- Perturbateurs Endocriniens : étude Longitudinale sur les Anomalies de la Grossesse, l'Infertilité et l'Enfance
- Etude des conséquences à long terme des expositions prénatales et pendant l'enfance aux contaminants de l'environnement sur la grossesse et le développement de l'enfant
- Recrutement de 3421 femmes entre 2002 et 2006 avant 19 semaines aménorrhée



Les études françaises fondées sur la cohorte PELAGIE : déterminants de l'exposition

- Fréquence plus élevée **d'alachlore et acétochlore** dans les urines des femmes (n=579) vivant en **milieu rural**
- Présence de métabolites d'**atrazine** associée à la **proximité aux cultures de maïs**, et corrélée à la **consommation d'eau du robinet**

Chevrier et al. 2014. Envi Int:63

- Surexposition au **fenpropimorphe** et **azoxystrobine** (fongicides) chez les femmes (n=40) résidant dans des communes où la **culture de céréales** couvre >17% de la SAU

Jamin et al. 2014. Anal Bioanal Chem:406

Les études françaises fondées sur la cohorte PELAGIE : risques sanitaires suspectés

- La présence d'**atrazine** (ou métabolites) dans les urines des femmes au 1er trimestre de la grossesse est associée à un risque d'avoir un enfant de **petit poids** ou de **petit périmètre crânien** à la naissance

Chevrier et al. 2011. EHP: 119

- Le risque d'avoir un enfant avec un **petit périmètre crânien** est plus élevé chez les femmes qui vivent dans des communes où **pois et pommes de terre sont cultivés**. Tendance observée également avec les **cultures de céréales**

Petit et al. 2010. Environ Health: 9

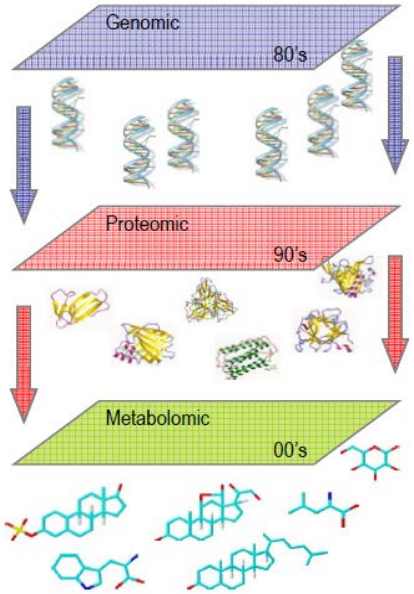
Et ailleurs?

- Les données de la littérature suggèrent également :
  - **des retards de croissance fœtale** (organophosphorés et triazines)
  - **des anomalies congénitales** (herbicides)
  - **des altérations du développement neurologiques** (organophosphorés et pyréthrinoïdes) (INSERM, 2013)

- **Mais difficultés d'établir des liens causaux : problématique des mélanges complexes et des faibles doses**
  - Quelle mesure de l'exposition?
  - Comment mesurer?
  - Quels indicateurs utiliser?

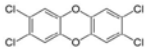
Des outils novateurs pour améliorer les connaissances : les « omics »

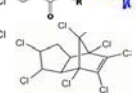
- La métabolomique, à l'instar de la génomique ou de la protéomique, est une technique d'analyse « haut-débit » mais qui s'intéresse aux **métabolites**
- Elle identifie de manière non ciblée l'ensemble des métabolites dans un fluide, un tissu, une cellule de l'organisme : **empreinte métabolique**
- Son intérêt réside dans l'utilisation directe de « matrices » humaines (sang, urine, salive…)



Tous les composés chimiques produits ou intermédiaires issus du métabolisme cellulaire de l'organisme qui participent à la croissance, à l'homéostasie et au maintien de ses fonctions

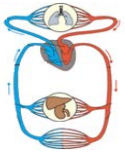
Oligopeptides, acides aminés, sucres, acides gras simples, acides biliaires, acides organiques, vitamines, polyphénols, alcaloïdes, minéraux, hormones…





Dose externe

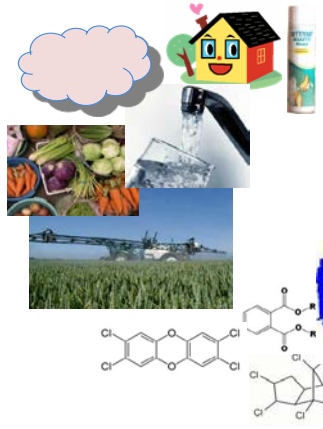
Dose interne



Dose à la cible

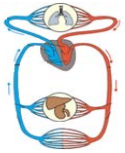
Interactions

Évènements clés
Mécanismes d'action



Dose externe

Dose interne

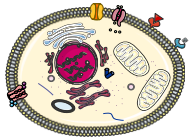


Dose à la cible

Interactions

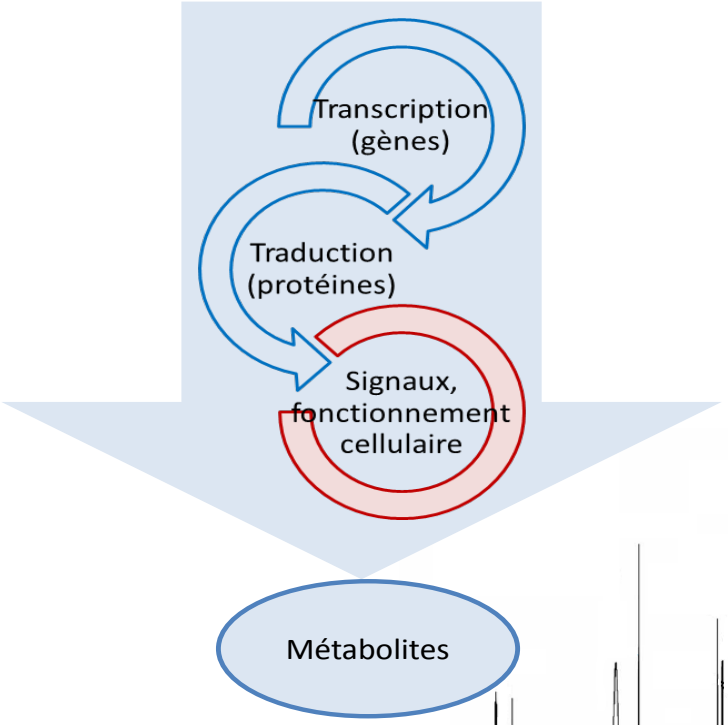
Évènements clés Mécanismes d'action

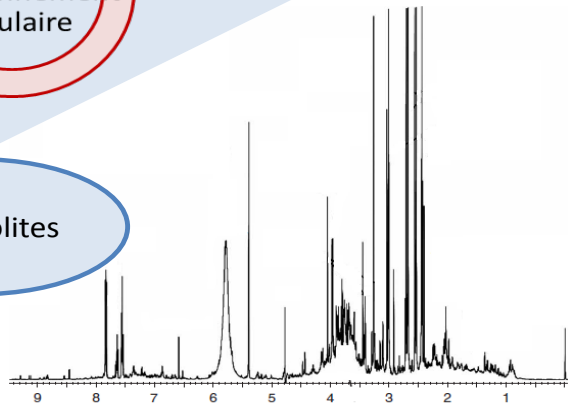
Réponse cellulaire



Effet toxique

REPONSE CELLULAIRE



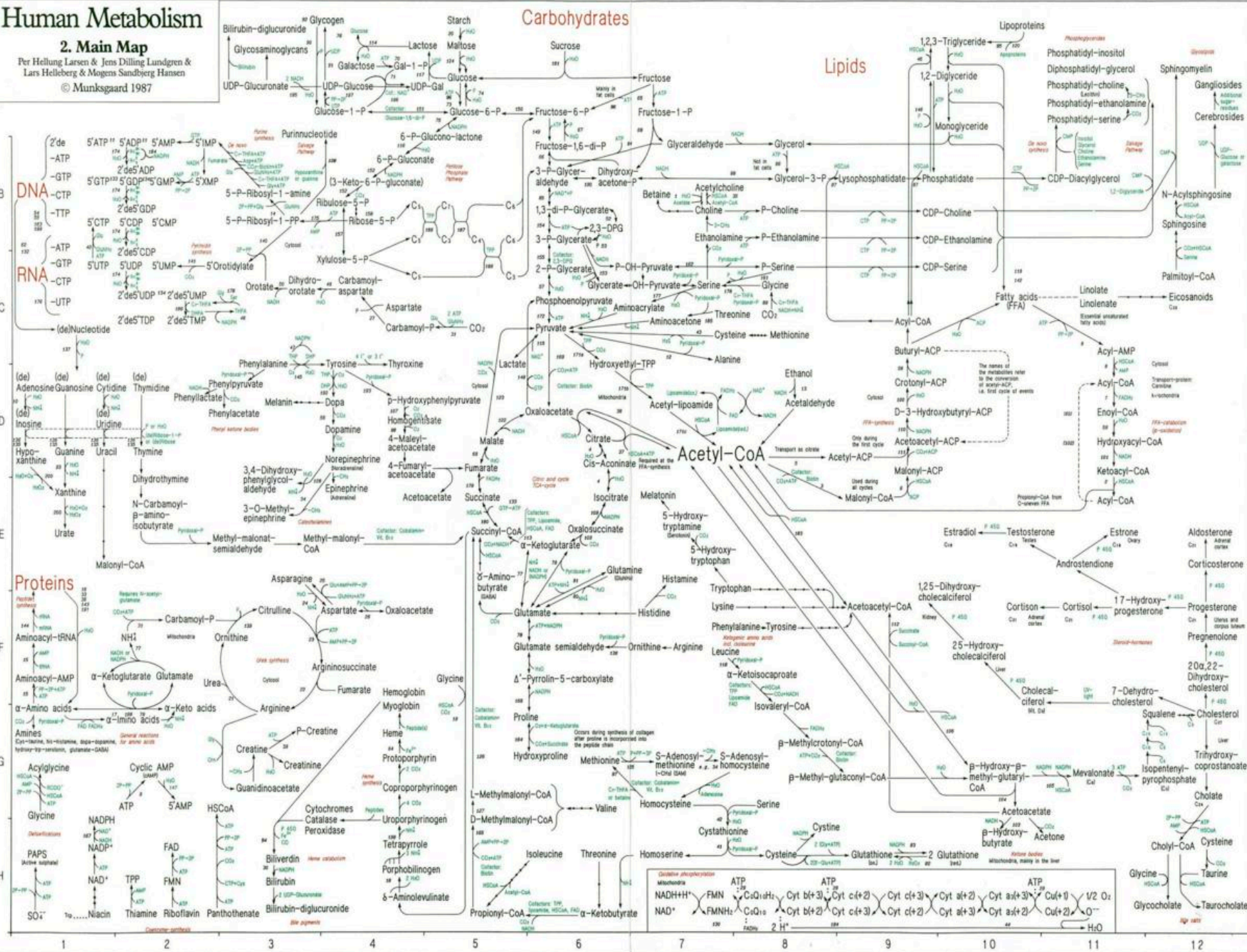


Human Metabolism

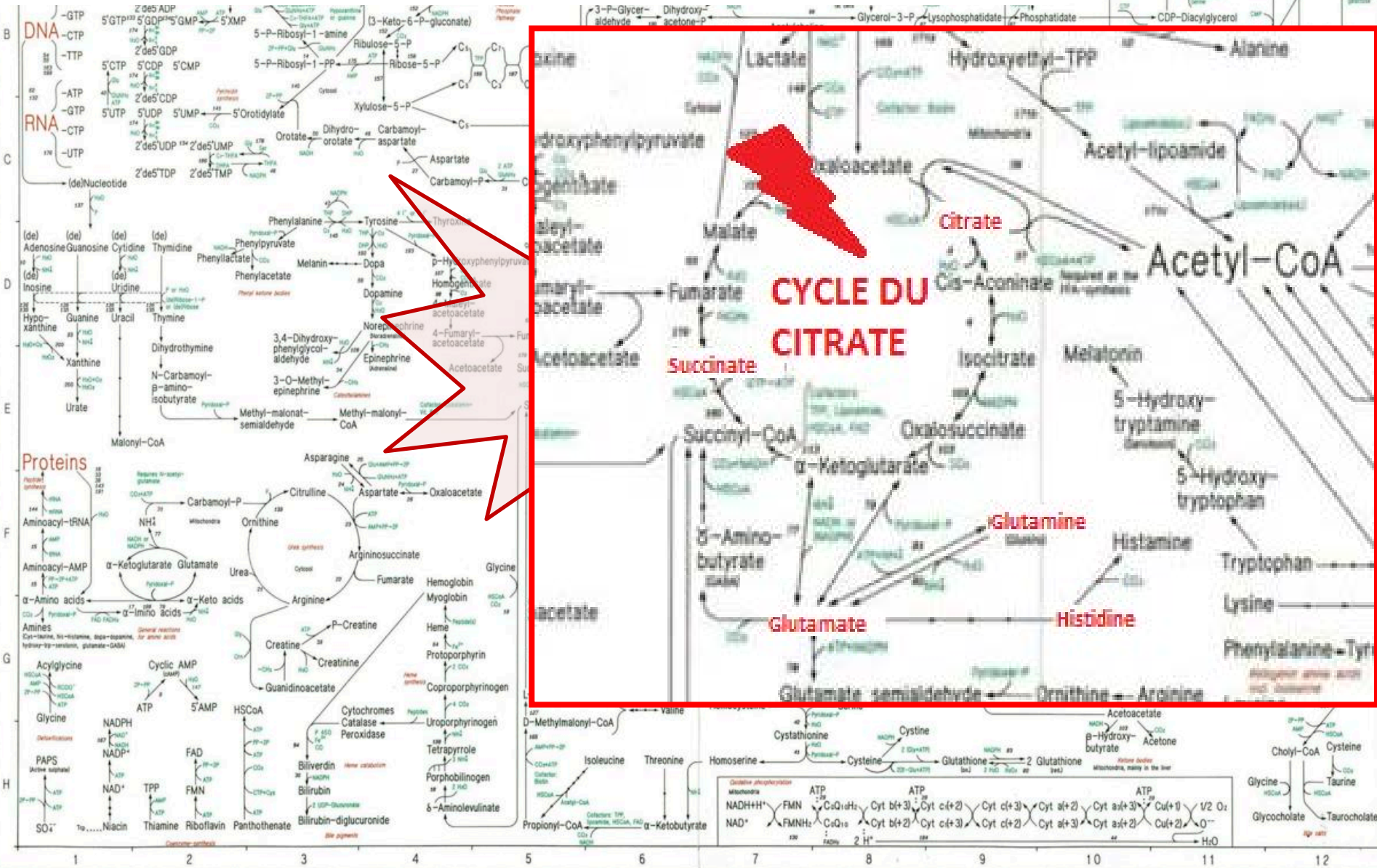
2. Main Map

Per Hellung Larsen & Jens Dilling Lundgren & Lars Helleberg & Mogens Sandbjerg Hansen

© Munksgaard 1987


Carbohydrates
Lipids
Proteins
DNA
RNA
Acetyl-CoA
Pyruvate
Glucose
Glycogen
Starch
Sucrose
Fructose
Glucose-6-P
Fructose-6-P
Fructose-1,6-di-P
Glyceraldehyde
Glycerol
Glycerol-3-P
Phosphatidate
Lipoproteins
1,2,3-Triglyceride
1,2-Diglyceride
Monoglyceride
Phosphatidyl-inositol
Diphosphatidyl-glycerol
Phosphatidyl-choline
Phosphatidyl-ethanolamine
Phosphatidyl-serine
Sphingomyelin
Gangliosides
Cerebrosides
N-Acylsphingosine
Sphingosine
Palmitoyl-CoA
CDP-Diacylglycerol
CDP-Choline
CDP-Ethanolamine
CDP-Serine
Fatty acids (FFA)
Linolate
Linolenate
Eicosanoids
Acyl-CoA
Acyl-AMP
Enoyl-CoA
Hydroxyacyl-CoA
Ketoacyl-CoA
Acyl-CoA
Buturyl-ACP
Crotonyl-ACP
D-3-Hydroxybutyryl-ACP
Acetoacetyl-ACP
Acetyl-ACP
Malonyl-ACP
Malonyl-CoA
Acetyl-lipoamide
Acetaldehyde
Ethanol
Citrate
Cis-Aconitate
Isocitrate
Oxalosuccinate
α-Ketoglutarate
Succinyl-CoA
Succinate
Fumarate
Malate
Oxaloacetate
Acetoacetate
4-Fumaryl-acetoacetate
4-Maleyl-acetoacetate
Homogentisate
p-Hydroxyphenylpyruvate
Phenylpyruvate
Phenylalanine
Tyrosine
Thyroxine
Phenylactate
Phenylacetate
Melanin
Dopa
Dopamine
Norepinephrine
Epinephrine
3,4-Dihydroxy-phenylglycol-aldehyde
3-O-Methyl-epinephrine
Melatonin
5-Hydroxy-tryptamine
5-Hydroxy-tryptophan
Glutamine
Glutamate
Glutamate semialdehyde
Δ'-Pyrrolin-5-carboxylate
Proline
Hydroxyproline
Histamine
Histidine
Ornithine
Arginine
Asparagine
Aspartate
Citrulline
Carbamoyl-P
Argininosuccinate
Urea
Fumarate
Creatine
P-Creatine
Creatinine
Guanidinoacetate
Glycine
Acylglycine
Cyclic AMP
5'AMP
ATP
Cytochromes
Catalase
Peroxidase
Biliverdin
Bilirubin
Bilirubin-diglucuronide
Hemoglobin
Myoglobin
Heme
Protoporphyrin
Coproporphyrinogen
Uroporphyrinogen
Tetrapyrrole
Porphobilinogen
δ-Aminolevulinate
Propionyl-CoA
α-Ketobutyrate
Isoleucine
Threonine
Valine
L-Methylmalonyl-CoA
D-Methylmalonyl-CoA
Methionine
S-Adenosyl-methionine
S-Adenosyl-homocysteine
Homocysteine
Serine
Cystathionine
Cysteine
Homoserine
Glutathione
2 Glutathione
Cystine
Acetoacetate
β-Hydroxy-butyrate
Acetone
β-Hydroxy-β-methyl-glutaryl-CoA
β-Methyl-glutaconyl-CoA
β-Methylcrotonyl-CoA
Isovaleryl-CoA
α-Ketoisocaproate
Leucine
Phenylalanine
Tyrosine
Lysine
Tryptophan
Acetoacetyl-CoA
Mevalonate
Isopentenyl-pyrophosphate
Cholesterol
Squalene
7-Dehydro-cholesterol
Cholecal-ciferol
25-Hydroxy-cholecalciferol
1,25-Dihydroxy-cholecalciferol
Cortison
Cortisol
17-Hydroxy-progesterone
Progesterone
Pregnenolone
20α,22-Dihydroxy-cholesterol
Trihydroxy-coprostanoate
Cholate
Cholyl-CoA
Glycocholate
Taurocholate
Taurine
Estradiol
Testosterone
Estrone
Androstendione
Aldosterone
Corticosterone
Aminoacyl-tRNA
Aminoacyl-AMP
α-Amino acids
α-Imino acids
α-Keto acids
Amines
Glutamine
Urate
Xanthine
Hypo-xanthine
Guanine
Uracil
Thymine
Dihydrothymine
N-Carbamoyl-β-amino-isobutyrate
Methyl-malonat-semialdehyde
Methyl-malonyl-CoA
Malonyl-CoA
Adenosine
Guanosine
Cytidine
Thymidine
Inosine
Uridine
(de)Nucleotide
Purinnucleotide
5-P-Ribosyl-1-amine
5-P-Ribosyl-1-PP
Ribose-5-P
Ribulose-5-P
Xylulose-5-P
6-P-Gluconate
6-P-Glucono-lactone
Orotate
Dihydro-orotate
Carbamoyl-aspartate
Aspartate
Carbamoyl-P
Orotidylate
Phosphoenolpyruvate
Pyruvate
Lactate
Hydroxyethyl-TPP
Aminoacrylate
Aminoacetone
Threonine
Cysteine
Methionine
Alanine
Serine
Glycine
P-Serine
P-Ethanolamine
P-Choline
Choline
Betaine
Acetylcholine
Ethanolamine
Glycerate
OH-Pyruvate
P-OH-Pyruvate
2-P-Glycerate
3-P-Glycerate
1,3-di-P-Glycerate
2,3-DPG
3-P-Glycer-aldehyde
Dihydroxy-acetone-P
Fructose-1-P
Glucose-1-P
UDP-Glucose
UDP-Gal
UDP-Glucuronate
Galactose
Gal-1-P
Lactose
Maltose
Glycosaminoglycans
Bilirubin-diglucuronide
Oxidative phosphorylation
Mitochondria
NADH+H+
NAD+
FMN
FMNH2
CoQ10
Cyt b(+3)
Cyt b(+2)
Cyt c1(+2)
Cyt c1(+3)
Cyt c(+3)
Cyt c(+2)
Cyt a(+2)
Cyt a(+3)
Cyt a3(+3)
Cyt a3(+2)
Cu(+1)
Cu(+2)
1/2 O2
O--
2 H+
H2O
ATP
Niacin
Thiamine
Riboflavin
Panthothenate
NADPH
NADP+
NAD+
FAD
FMN
TPP
PAPS
SO4--
HSCoA
Biliverdin
Bilirubin
Bilirubin-diglucuronide
Bile pigments
Cholesterol
Bile salts
Ketone bodies
Mitochondria, mainly in the liver
Urea cycle
Citric acid cycle
Fatty acid synthesis
Fatty acid catabolism
Steroid hormones
Vitamin D
Vitamin A
Vitamin K
Vitamin B12
Vitamin C
Vitamin E
Vitamin B1
Vitamin B2
Vitamin B6
Vitamin B3
Vitamin B5
Vitamin B7
Vitamin B9
Vitamin B12
Vitamin C
Vitamin E
Vitamin K
Vitamin A
Vitamin D

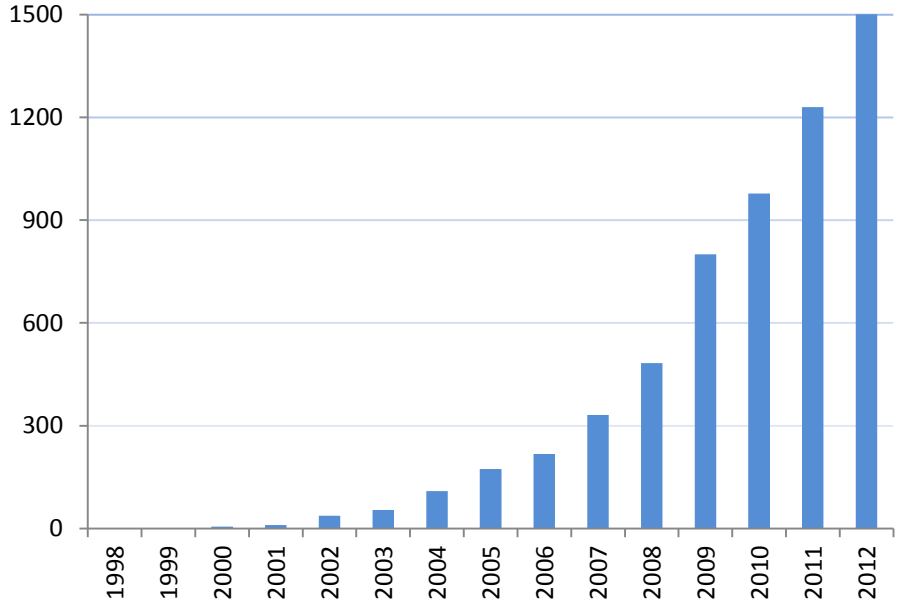
L'identification de métabolites modifiés entre différents groupes d'individus et la recherche dans les bases de données sur le métabolisme humain permettent d'identifier des voies métaboliques modifiées / altérées



Le développement de la métabolomique

Développement parallèle à celui des techniques d'analyse de pointe (spectroscopie RMN et de masse) et des outils statistiques de plus en plus perfectionnés (analyses multivariées)

Evolution du nombre de publications indexées dans Pubmed comportant les termes « metabolomics » ou « metabonomics »



La métabolomique à l'étude des pesticides

Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, 17:21–44, 2014
Copyright © Taylor & Francis Group, LLC
ISSN: 1093-7404 print / 1521-6950 online
DOI: 10.1080/10937404.2013.860318

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

POTENTIAL INPUT FROM METABOLOMICS FOR EXPLORING AND UNDERSTANDING THE LINKS BETWEEN ENVIRONMENT AND HEALTH

Nathalie Bonvallot[1,2,3], Marie Tremblay-Franco[3], Cecile Chevrier[1,4], Cecile Canlet[3], Laurent Debrauwer[3], Jean-Pierre Cravedi[3], Sylvaine Cordier[1,4]

- > 15 publications relatives aux effets des pesticides sur le métabolisme entre 2009 et 2014, basées sur l'expérimentation animale
- Les études portent sur les expositions aux **insecticides** (**organochlorés**, **organophosphorés**, **carbamates**, **pyréthrinoïdes** et à quelques **mélanges**)

Pesticides	Protocoles	Principaux résultats	Références
Endosulfan (OC*)	Souris – voie orale - périodes pré/ post-natale	Stress oxydant hépatique	Canlet et al. 2013
Propoxur (carbamate)	Rats ♂ - voie orale - 28 j	Stress oxydant, altération du métabolisme énergétique et lipidique (cétogénèse et β-oxydation)	Liang et al. 2012a,b
Dichlorvos (OP*)	Rats ♂ - voie orale - 24 sem	Stress oxydant, altération du métabolisme des sucres et des acides gras	Yang et al. 2011, 2013
Diméthoate (OP)	Rats ♂ - voie orale - 24 sem	Stress oxydant, altération du métabolisme des acides gras, des acides aminés, et du cycle du citrate	Feng et al. 2012
Acéphate (OP)	Rats ♂ - voie orale - 24 sem	Altération du métabolisme du glucose, des acides nucléiques et des protéines	Hao et al. 2012
Phorate (OP)	Rats ♂ - voie orale - 24 sem	Stress oxydant, altération du métabolisme énergétique et des acides nucléiques	X. Sun et al. 2012
Chlorpyrifos + carbaryl (OP/ CARB*)	Rats – voie orale – 90 j	Altération du métabolisme énergétique et des acides gras dans le foie	Wang et al. 2009, 2011
Dichlorvos + deltaméthrine (OP/ PYR*)	Rats – voie orale – 90 j	Altération du métabolisme énergétique hépatique	Wang et al. 2013
Propoxur + perméthrine (CARB/ PYR)	Rats – voie orale – 90 j	Altération du métabolisme énergétique (cycle du citrate, métabolisme du glucose, ↗ β-oxydation)	Liang et al. 2012c
Perméthrine + deltaméthrine (PYR)	Rats ♂– voie orale – 60 j	Altération du métabolisme énergétique (↗ glycolyse anaérobie, β-oxydation et cétogénèse)	Liang et al. 2013
Dichlorvos + diméthoate + acéphate + phorate (OP)	Rats ♂ - voie orale - 24 sem	Stress oxydant, dommage à l'ADN, altération du métabolisme des lipides et du métabolisme énergétique	Du et al. 2013
Endosulfan + atrazine + chlorpyrifos (OC/ OP/ triazine)	Souris – voie orale - périodes pré/ post-natale	Altérations du métabolisme des acides aminés et du glucose, des cycles du citrate et de l'urée	Demur et al. 2013
Mélange de 6 pesticides (OC/ OP/ dithiocarbamates)	Souris – voie orale – 4 sem	Stress oxydant et altération du métabolisme du glucose au niveau hépatique	Mehri et al. 2010

** OC: organochlorés; OP : organophosphorés; CARB : carbamates ; PYR : pyréthrinoïdes*

Pesticides	Protocoles	Principaux résultats	Références
Endosulfan (OC*)	Souris – voie orale - périodes pré/ post-natale	**Stress oxydant hépatique**	Canlet et al. 2013
Propoxur (carbamate)	Rats ♂ - voie orale - 28 j	**Stress oxydant, altération du métabolisme énergétique et lipidique (cétogénèse et β-oxydation)**	Liang et al. 2012a,b
Dichlorvos (OP*)	Rats ♂ - voie orale - 24 sem	Stress oxydant, altération du métabolisme des sucres et des acides gras	Yang et al. 2011, 2013
Diméthoate (OP)	[illegible] - 24	**Stress oxydant, altération du métabolisme des acides gras, des acides aminés, et du cycle du citrate**	Feng et al. 2012
Acéphate (OP)		Altération du métabolisme du glucose, des acides nucléiques et des protéines	Hao et al. 2012
Phorate (OP)		**Stress oxydant, altération du métabolisme énergétique et des acides nucléiques**	X. Sun et al. 2012
Chlorpyrifos + carbaryl (OP/ CARB*)	Rats – voie orale – 90 j	Altération du métabolisme énergétique et des acides gras dans le foie	Wang et al. 2009, 2011
Dichlorvos + deltaméthrine (OP/ PYR*)	Rats – voie orale – 90 j	Altération du métabolisme énergétique hépatique	Wang et al. 2013
Propoxur + perméthrine (CARB/ PYR)	Rats – voie orale – 90 j	**Altération du métabolisme énergétique (cycle du citrate, métabolisme du glucose, ↗ β-oxydation)**	Liang et al. 2012c
Perméthrine + deltaméthrine (PYR)	Rats ♂– voie orale – 60 j	Altération du métabolisme énergétique (↗ glycolyse anaérobie, β-oxydation et cétogénèse)	Liang et al. 2013
Dichlorvos + diméthoate + acéphate + phorate (OP)	Rats ♂ - voie orale - 24 sem	**Stress oxydant, dommage à l'ADN, altération du métabolisme des lipides et du métabolisme énergétique**	Du et al. 2013
Endosulfan + atrazine + chlorpyrifos (OC/ OP/ triazine)	Souris – voie orale - périodes pré/ post-natale	**Altérations du métabolisme des acides aminés et du glucose, des cycles du citrate et de l'urée**	Demur et al. 2013
Mélange de 6 pesticides (OC/ OP/ dithiocarbamates)	Souris – voie orale – 4 sem	**Stress oxydant et altération du métabolisme du glucose au niveau hépatique**	Mehri et al. 2010

FAIBLES DOSES (≈DJA ou NOAEL)

** OC: organochlorés; OP : organophosphorés; CARB : carbamates ; PYR : pyréthrinoïdes*

Un projet fondé sur deux hypothèses

- L'exposition à une substance toxique conduit à une modification du métabolome (Robertson, 2005, Tox Sci.)

- Les expositions à des mélanges complexes de molécules, même à faible dose, peuvent conduire à des effets (Kortenkamp, 2010, Int J Andr)

Objectifs

- Explorer l'influence des expositions aux pesticides sur les empreintes métaboliques de femmes enceintes et de leur enfant

- Caractériser les métabolites discriminants pour suggérer des hypothèses mécanistiques sur le lien entre les modifications métaboliques retrouvées et les expositions de la population

OPEN ACCESS Freely available online PLOS | ONE

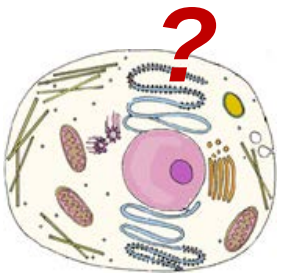
Metabolomics Tools for Describing Complex Pesticide Exposure in Pregnant Women in Brittany (France)

Nathalie Bonvallot[1,2,3]*, Marie Tremblay-Franco[3], Cécile Chevrier[4,5], Cécile Canlet[3], Charline Warembourg[4,5], Jean-Pierre Cravedi[3], Sylvaine Cordier[4,5]

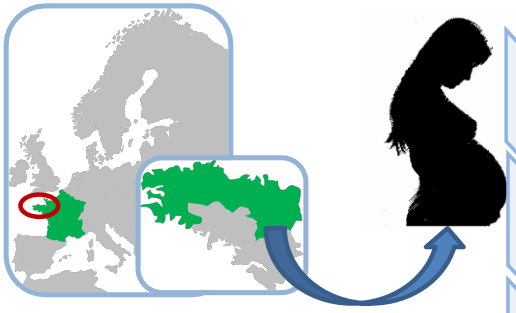
PLOS ONE | www.plosone.org May 2013 | Volume 8 | Issue 5 | e64433

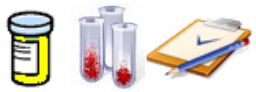
Stratégie méthodologique

Choix de la population et recueil des échantillons → Constitution des groupes d'exposition → Analyse métabolomique → Prise en compte des facteurs de confusion → Interprétation biologique et hypothèses mécanistiques



La population issue de la cohorte PELAGIE





n=3421
- Pregnant women included between 2002 and 2006 in Brittany, France

n=3322
- Living singletons

n=1061
- Availability of samples (urine in early gestation & cord blood at birth)

n=338
- Sample frozen in 2004

n=86
- Same gestational age for urine samples (11th week of pregnancy)

Inserm
Institut national de la santé et de la recherche médicale
irset
Institut de recherche sur la santé, l'environnement et le travail

La constitution des groupes d'exposition

- La proximité à des cultures agricoles / vivre en région rurale est un facteur de risque d'exposition aux pesticides *(Shirangi et al, 2011, Brender et al, 2011, Gunier et al, 2011, EHP)*
- En Bretagne, les grandes cultures concernent surtout le maïs et les céréales

3 groupes d'exposition en fonction de la part de cultures de céréales (% surface agricole utile) dans la commune de résidence des femmes

n=86 – 3 outliers retirés après une ACP

1er tercile	0-17%	n=40
2ème tercile	>17 - <25%	n=20
3ème tercile	≥ 25%	n=23

Caractéristiques de la population (n=83)

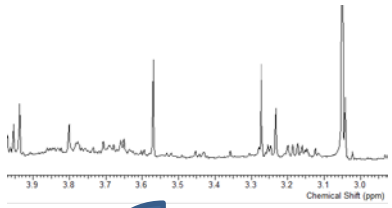
	Total n (%)	Groupe 1 n (%)	Groupe 2 n (%)	Groupe 3 n (%)	p-value
Nombre de femmes	83 (100%)	40 (48.2%)	20 (24.1%)	23 (27.7%)	
Niveau d'éducation					0.68
Ecole/ collège	12 (14.5%)	8 (22.0%)	2 (10.0%)	2 (8.7%)	
Baccalauréat	22 (26.5%)	9 (22.5%)	7 (35.0%)	6 (26.1%)	
Etudes secondaires	49 (59.0%)	23 (57.5%)	11 (55.0%)	15 (65.2%)	
Age – médiane [Q1;Q3]	29.3 [27,0 ; 32,6]	31.5 [26.9 ; 33.7]	27.8 [26.9 ; 31.8]	29.1 [27.3 ; 31.1]	0.15
IMC – médiane [Q1;Q3]	21,4 [22,0 ; 23,8]	21.3 [20.5 ; 24.7]	21.0 [19.7 ; 22.2]	21.9 [20.1 ; 28.3]	0.30
Parité					**0.01**
1er enfant	29 (34.9%)	17 (42.5%)	9 (45.0%)	3 (13.0%)	
2ème enfant	36 (43.4%)	11 (27.5%)	9 (45.0%)	16 (69.6%)	
> 2	18 (21.7%)	12 (30.0%)	2 (10.0%)	4 (17.4%)	
Tabagisme					0.10
Non ou ex-fumeuses	59 (71.1%)	30 (76.9%)	12 (60.0%)	17 (73.9%)	
Ayant arrêté en début de grossesse	13 (15.7%)	2 (5.1%)	5 (25.0%)	5 (21.7%)	
Fumeuse	10 (12.0%)	7 (18.0%)	3 (15.0%)	1 (4.4%)	
Données manquantes	*1*	*1*			
Consommation d'alcool					0.84
Pas d'alcool	71 (85.5%)	34 (87.2%)	18 (90.0%)	19 (82.6%)	
Occasionnellement ou un verre/ jour	11 (13.3%)	5 (12.8%)	2 (10.0%)	4 (17.4%)	

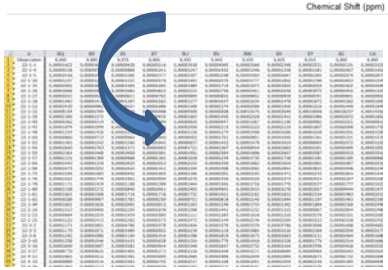
L'analyse métabolomique

Préparation des échantillons → Spectroscopie RMN du proton → Pré-traitement des données et bucketing → Analyses mutlivariées (ACP, PLS-DA) → Identification des métabolites

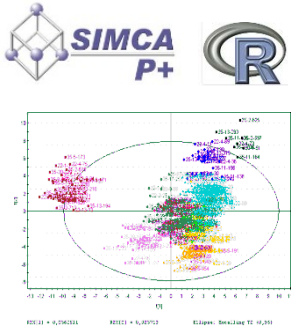
Ajout de D20, ± solution tampon, TSP
Centrifugation
Tubes RMN

Spectromètre 600 MHz
Suppression du signal de l'eau et des grosses molécules

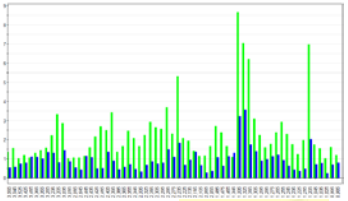




Phasage, calibrage, correction de la ligne de base
Numérisation des spectres en région de 0.01 ppm

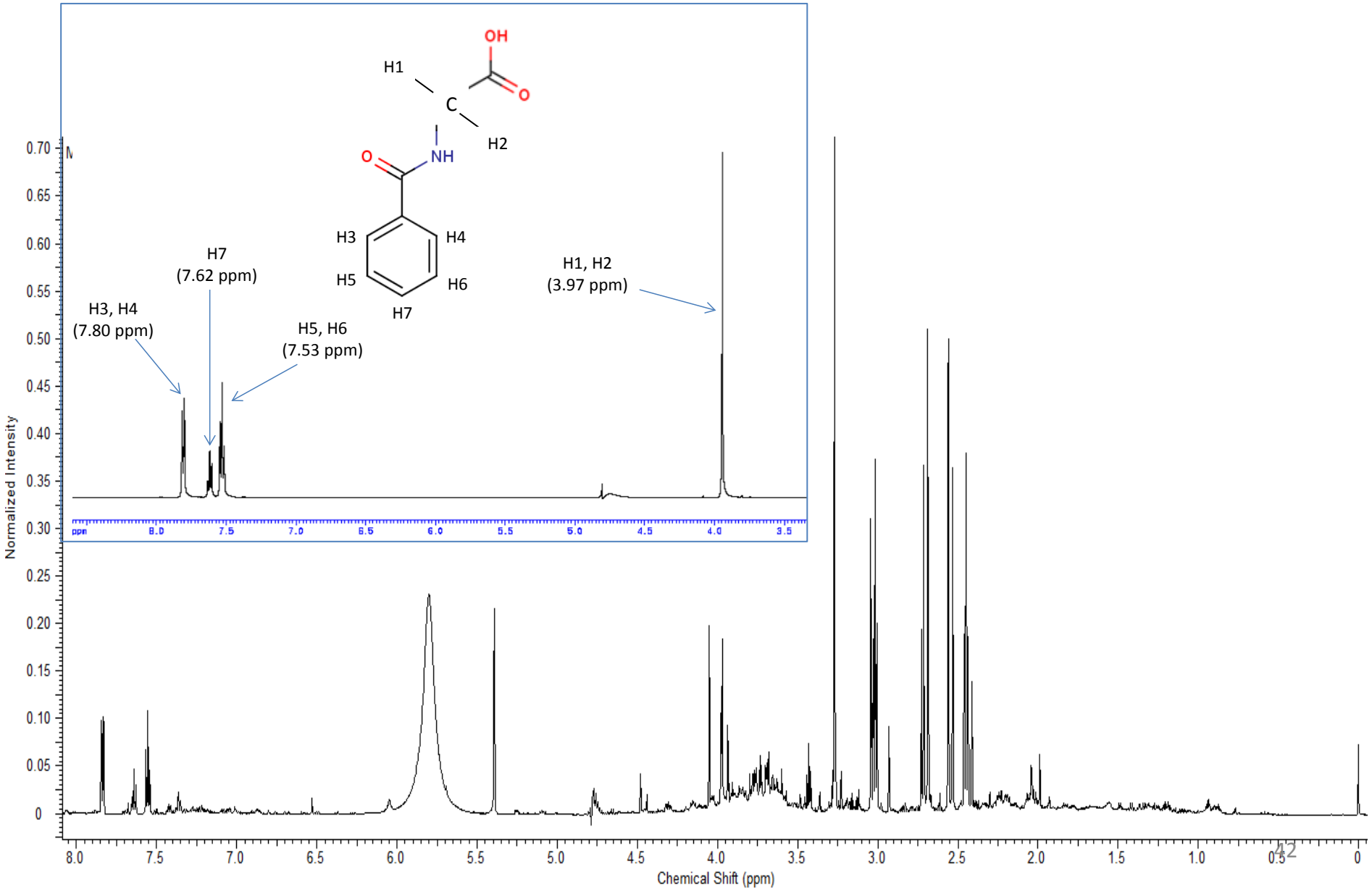


Importation des données dans SIMCA et R
Standardisation
Méthodes de PLS-DA (réduction de la dimensionnalité) par calcul de variables latentes qui maximise la covariance entre les variables X et les groupes d'exposition



Identification des variables les plus contributives dans la construction des variables latentes,
Retour aux spectres, consultation de BDD Internet

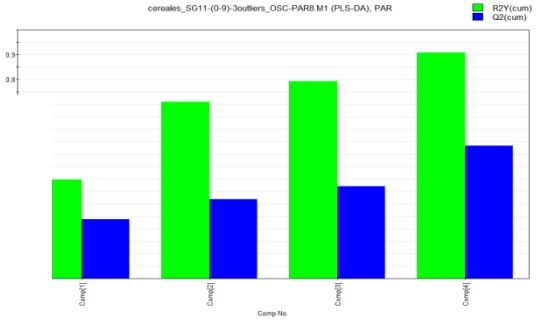
Spectres RMN urine

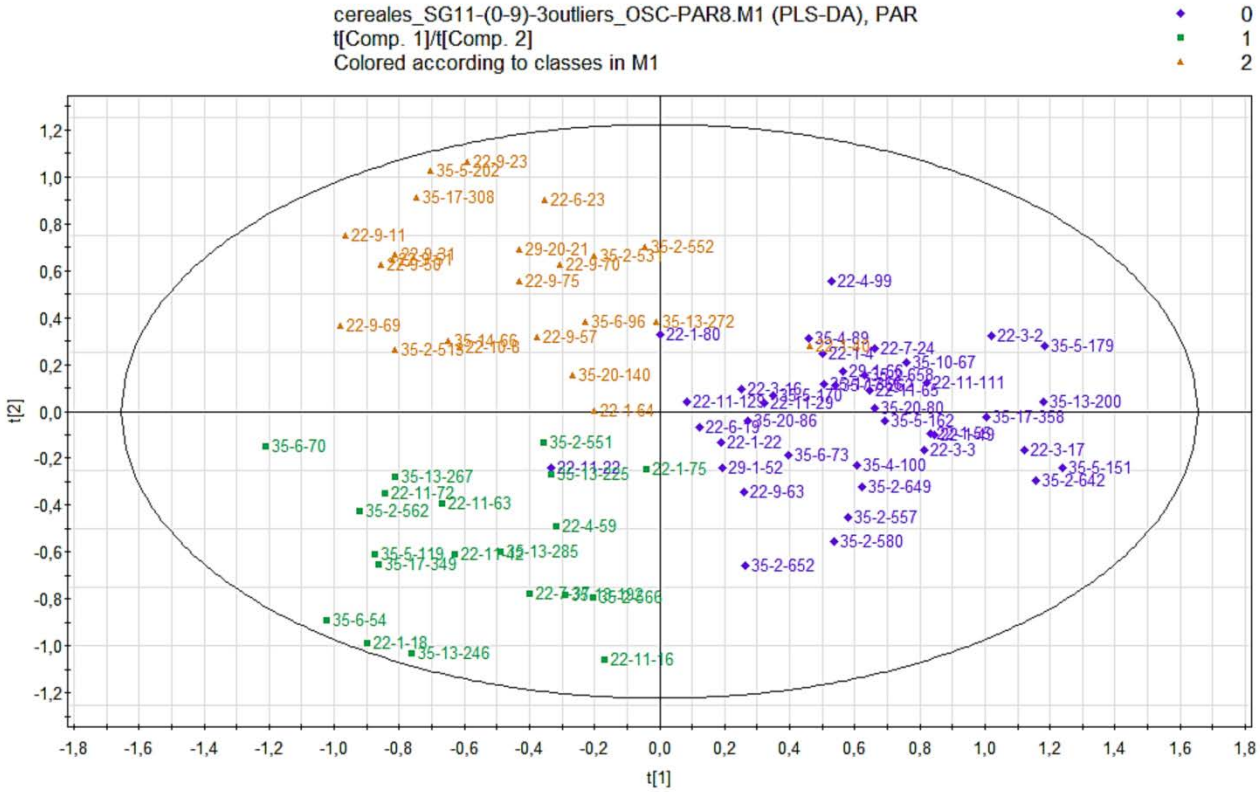


Modélisations PLS-DA

Modèle de PLS-DA après filtration OSC et standardisation de Pareto

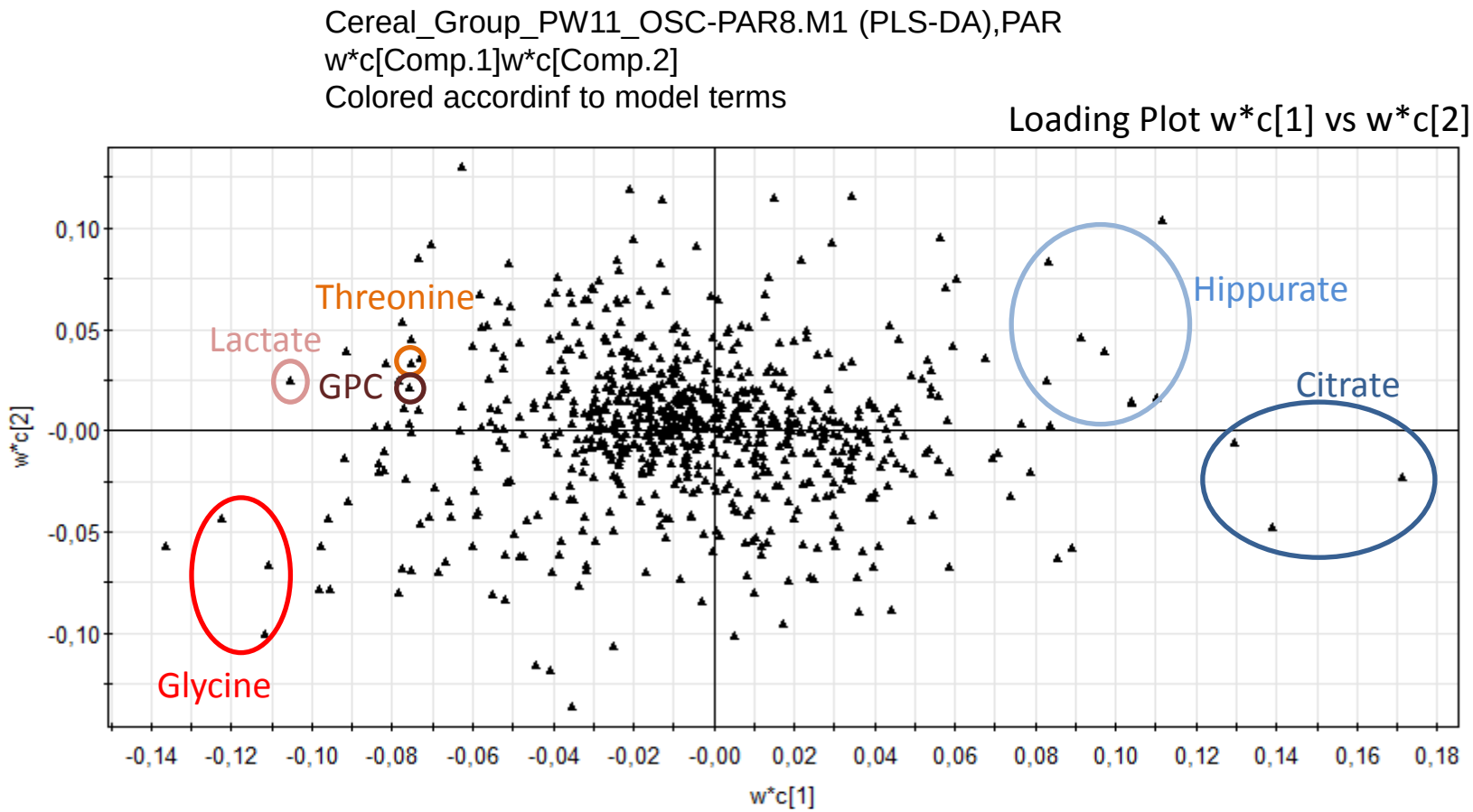
- 4 composantes principales sur variables latentes. Les deux premières expliquent plus de 70% de la variance totale
- R2CUM = 90,7% – Q2CUM = 0.53





Group 1 = 0-17% céréales - Group 2 = >17-25% céréales - Group 3 = >25% céréales

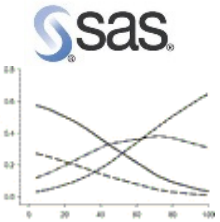
Identifications des métabolites



Métabolites importants et statistiquement significativement différents entre les groupes (au moins 1 versus 2 et 3), Kruskal-Wallis, $p<0.05$

Ajustement sur les facteurs de confusion

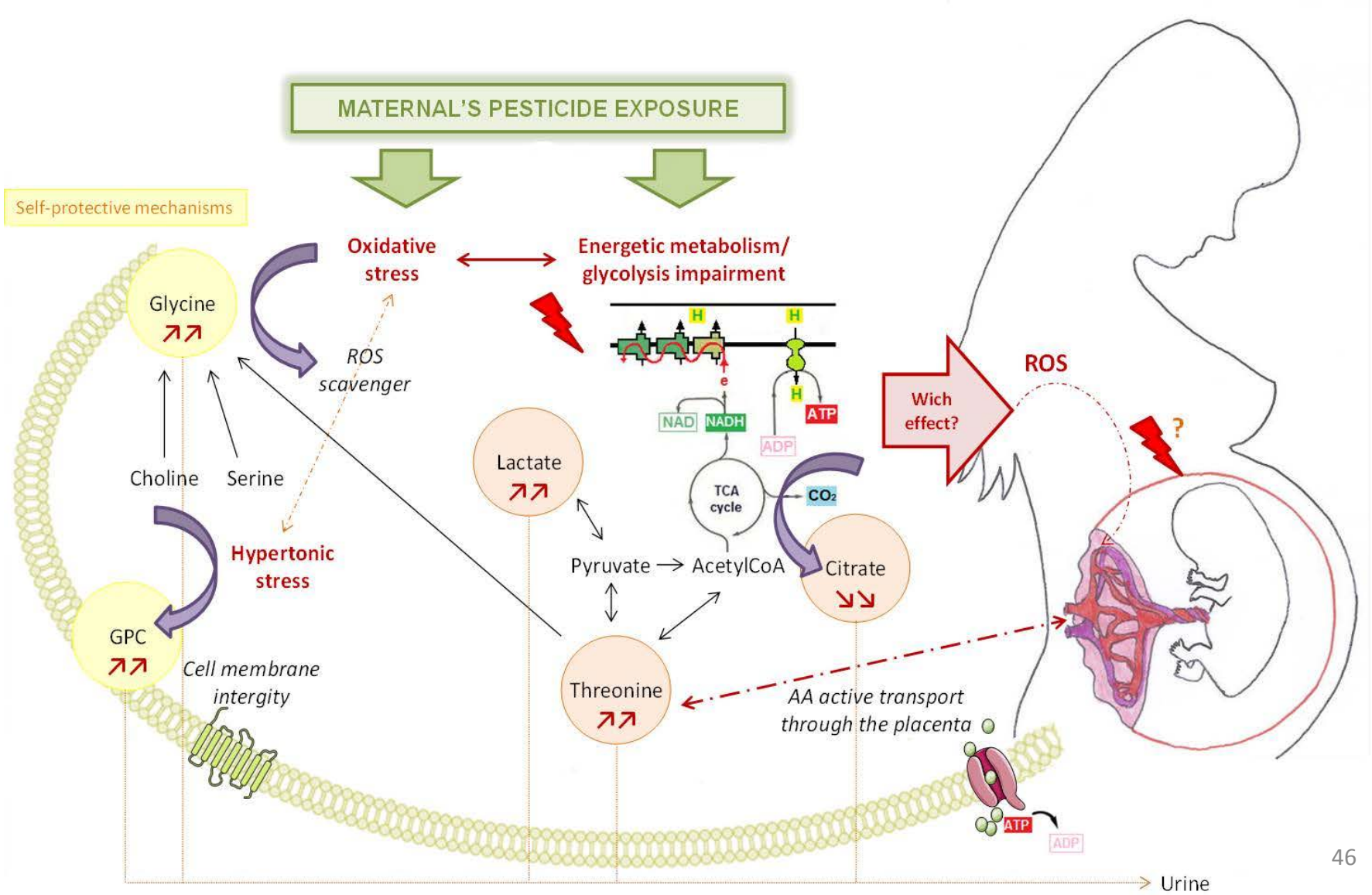
Association entre concentrations de métabolites urinaires et groupes d'exposition



Métabolites	Groupes d'exposition	n	OR ajustés* (95%CI)	p-value
Glycine	1	37	Ref	
	2	20	**1.32 (1.12 ; 1.57)**	0.001
	3	23	**1.30 (1.10 ; 1.53)**	0.002
Thréonine	1	37	Ref	
	2	20	**1.60 (1.01 ; 2.54)**	0.04
	3	23	**2.06 (1.26 ; 3.35)**	0.004
Lactate	1	37	Ref	
	2	20	**1.42 (1.12 ; 1.81)**	0.004
	3	23	**1.54 (1.21 ; 1.98)**	0.0006
Glycéro-phosphocholine	1	37	Ref	
	2	20	**1.26 (1.01 ; 1.56)**	0.04
	3	23	**1.37 (1.09 ; 1.72)**	0.006
Citrate	1	37	Ref	
	2	20	0.98 (0.96 ; 1.00)	0.06
	3	23	**0.97 (0.95 ; 1.00)**	0.03
Hippurate	1	37	Ref	
	2	20	0.99 (0.98 ; 1.00)	0.23
	3	23	1.00 (0.99 ; 1.01)	0.51

*** Ajusté sur l'âge, la parité, l'IMC et le tabagisme**

Interprétation biologique



Conclusion

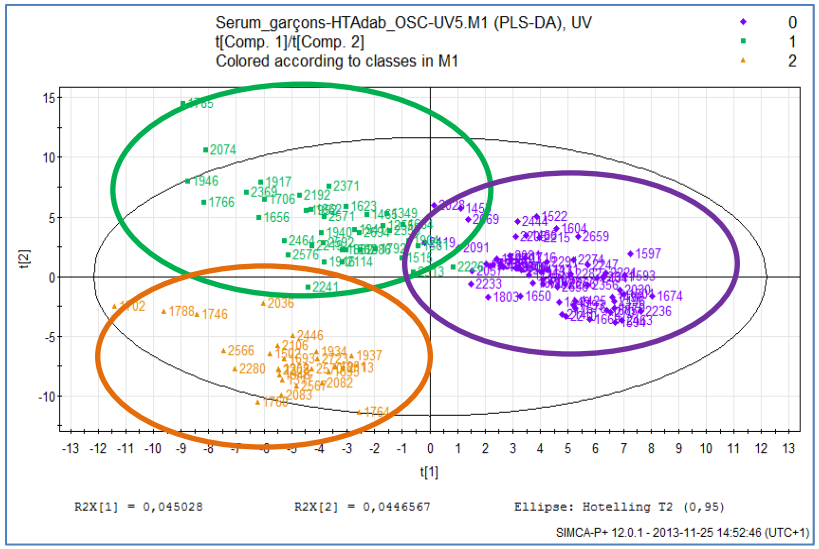
- 1ère étude exploratoire étudiant le **lien entre modifications métaboliques et expositions complexes aux pesticides chez la femme enceinte**

- Ces expositions pourraient induire un **stress oxydant** impliquant une **perturbation du métabolisme énergétique**

- Ces résultats sont **en accord avec les données toxicologiques de la littérature** montrant, **même à faible dose**, la possibilité d'un stress oxydant et de la modification du métabolisme énergétique lors de l'exposition aux pesticides en mélange

Perspectives

- Analyses (en cours) des profils métaboliques des sangs de cordon à la naissance
- Discrimination possible en lien avec les groupes d'exposition initialement constitués (% cultures céréales dans la commune)



Groupe peu exposé (<17% céréales)

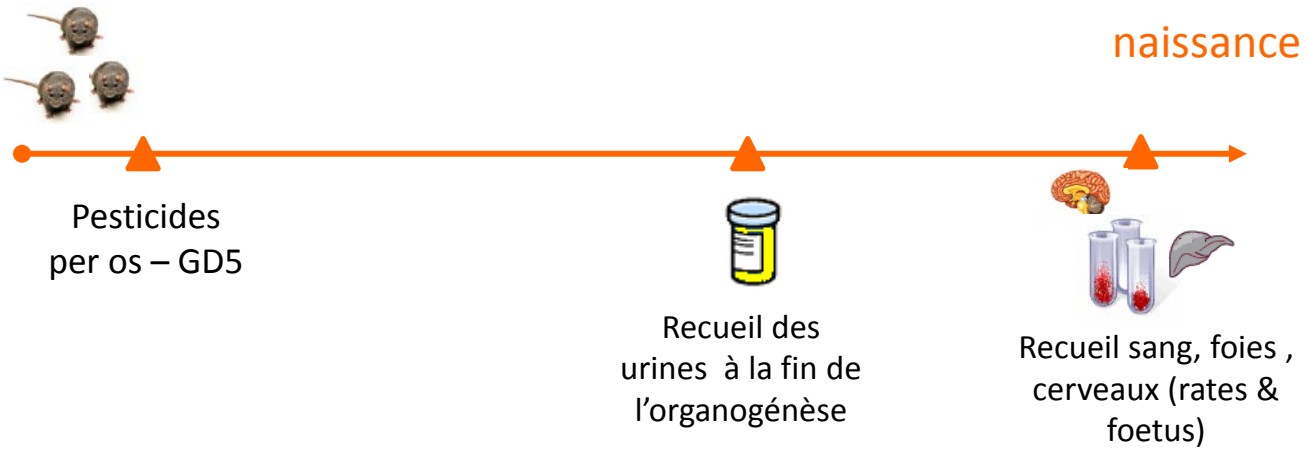
Groupe moyennement exposé (17-25%)

Groupe plus exposé (>25%)

Quels métabolites?
Quelles hypothèses mécanistiques?

Perspectives

- Association d'une démarche toxicologique pour conforter ces premières observations (hypothèses sur le stress oxydant) et mieux comprendre si lien avec des modifications métaboliques au niveau des organes chez la mère et l'enfant (foie, cerveau)
- Recueillir des échantillons biologiques similaires à ceux disponibles chez l'homme + complémentaires
- Se situer dans des conditions d'exposition proches de celles des femmes enceintes



Perspectives

Anal Bioanal Chem (2014) 406:1149–1161
DOI 10.1007/s00216-013-7136-2

RESEARCH PAPER

Untargeted profiling of pesticide metabolites by LC–HRMS: an exposomics tool for human exposure evaluation

Emilien L. Jamin · Nathalie Bonvallot · Marie Tremblay-Franco · Jean-Pierre Cravedi · Cécile Chevrier · Sylvaine Cordier · Laurent Debrauwer

List of 47 pesticides based on:

- agricultural practices in Brittany between 2000 and 2005 [*AGRESTE, French Ministry of Agricultural and Fishing*]:

wheat, corn, canola, peas, and vegetable crops

- study of the uses of pesticides on cereals in Brittany [*CORPEP, Cell Guidance for Regional Protection of Waters against Pesticides*]
- study of contamination of rivers in areas of vegetable crops in Brittany [*DIREN, Regional Directorate of Environment*]
- study of the uses of pesticides on peas [*ACTA, network of institutes of animal and plant sectors*]

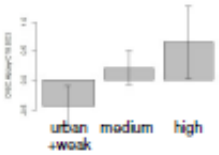
Acephate	Dichlorvos	Naled
Anthraquinone	Dimethachlor	Napropamide
Azinphos-methyl	Epoxiconazole	Omethoate
Azoxystrobin	Ethephon	Oxydemeton-methyl
Benfuracarb	Fenitrothion	Paclobutrazol
Carbendazim	Fenpropimorph	Pencycuron
Carbofuran	Glyphosate	Permethrin
Carbosulfan	Imidacloprid	Phosalone
Chlormequat	Iprodione	Procymidone
Chlorothalonil	Kresoxim-methyl	Propachlor
Chlorpropham	Lambda-cyhalothrin	Pirimicarb
Chlorpyrifos	Linuron	Quizalofop-ethyl
Clomazone	Malathion	Tebuconazole
Cymoxanil	Metazachlor	Thiophanate-methyl
Cypermethrin	Metconazole	Trifluralin
Deltamethrin	Methidathion	

- List of 386 metabolites:

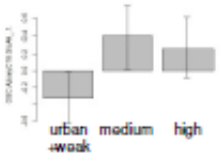
bibliography of selected pesticides + theoretical phase II metabolites

Azoxystrobin:

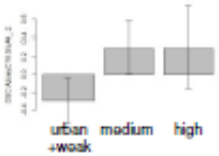
3 metabolites



C18-SO_3H
p=8.10^{-5}



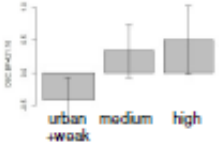
C18-GlcAc (1)
p=2.10^{-4}



C18-GlcAc (2)
p=2.10^{-4}

Fenpropimorph:

1 metabolite



BF421-16
p=2.10^{-4}

- Etendre l'étude d'exposomique (UHPLC - spectrométrie de masse haute résolution) réalisée sur 40 échantillons à l'ensemble de la population étudiée (n=338) en incluant plus de pesticides dans la liste initiale
- Analyse non ciblée (ne dépend que de la liste initiale de pesticides établie)
- Association d'une démarche de quantification ciblée (UHPLC-MS/MS)
- Permettra de mieux connaître l'exposition des femmes enceintes à proximité des cultures, qui ne dépend pas que de la volatilité des substances

Remerciements

Cohorte PELAGIE, aide à l'identification des groupes d'exposition, régressions logistiques

INSERM UMR 1085 IRSET

Equipe 9 : Recherches épidemiologiques sur l'environnement, la reproduction et le développement

Sylvaine Cordier
Cécile Chevrier
Charline Warembourg
Christine Monfort
Véronique Villalon
Et toute l'équipe PELAGIE

Analyses RMN, interprétation des données spectrales, analyses statistiques multivariées, HRMS

INRA UMR 1331 TOXALIM

Equipe 2 : Metabolisme des xénobiotiques

Jean-Pierre Cravedi
Daniel Zalko
Florence Blas-Y-Estrada
Marc Audebert
Elisabeth Perdu
Nicolas Cabaton
Sandrine Bruel
Jérôme Molina

Equipe 20 : AXIOM

Cécile Canlet
Marie Tremblay-Franco
Roselyne Gautier
Laurent Debrauwer
Emilien Jamin

FINANCEURS