

Université de Montréal

Développement, application et validation d'une nouvelle stratégie de mesure des indicateurs biologiques de l'exposition aux pyréthrinoïdes et aux pyréthrines chez l'humain

par
Marie-Chantale Fortin

Département de santé environnementale et santé au travail, École de santé publique
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Ph.D.
en santé publique
option toxicologie et analyse du risque

Janvier, 2009
© Marie-Chantale Fortin

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Développement, application et validation d'une nouvelle stratégie de mesure des indicateurs biologiques de l'exposition aux pyréthrinoïdes et aux pyréthrines chez l'humain

présentée par :

Marie-Chantale Fortin

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Robert Tardif
président-rapporteur

Michèle Bouchard
directeur de recherche

Gaétan Carrier
codirecteur

Audrey Smargiassi
membre du jury

Sami Haddad
examineur externe

André Dufresne
représentant du doyen de la FES

Résumé

Les pyréthrinoïdes et les pyréthrines sont des insecticides neurotoxiques auxquels on attribue également des effets néfastes sur les systèmes immunitaire, hormonal et reproducteur. Ils sont abondamment utilisés en agriculture, mais aussi en horticulture, en extermination et dans le traitement d'infestations parasitaires humaines et animales (gale, poux). Il y a donc un intérêt en santé environnementale à connaître l'ampleur de l'exposition humaine à ces pesticides. La mesure des métabolites urinaires des pyréthrinoïdes et des pyréthrines apparaît une approche de choix pour arriver à cette fin puisqu'elle permet, en théorie, d'obtenir un portrait global de l'exposition. Or, traditionnellement et par soucis de simplicité les concentrations (volumiques ou ajustées pour la créatinine) de ces biomarqueurs dans des urines ponctuelles sont déterminées, mais l'effet de l'utilisation de ces unités sur la validité des estimations de dose quotidienne absorbée n'a jamais été vérifié.

L'objectif général de cette thèse était donc de développer, appliquer et valider une nouvelle stratégie de mesure et d'analyse de biomarqueurs pour améliorer la précision et la fiabilité des évaluations de l'exposition individuelles et populationnelles aux pyréthrinoïdes et pyréthrines. Les objectifs spécifiques étaient : i) de caractériser l'exposition humaine à ces contaminants en région urbaine et rurale au Québec et ii) de comparer la validité de la nouvelle stratégie de mesure et d'analyse de biomarqueurs urinaires proposée avec les autres méthodes plus usuelles utilisées pour estimer l'exposition individuelle et populationnelle et les doses absorbées de pyréthrinoïdes.

Des adultes et des enfants, recrutés dans la population de l'Île de Montréal et de la Montérégie ont recueilli leurs urines pendant une période d'au moins douze heures et complété un questionnaire documentant les sources potentielles d'exposition. Les quantités de métabolites de pyréthriinoïdes et pyréthrines (pmol) mesurées dans les urines ont été ajustées pour une période de douze heures exactement et pour le poids corporel. Les quantités excrétées en région urbaine ont été comparées à celles excrétées en région rurale et les données individuelles et populationnelles ont été comparées à celles qui auraient été obtenues si des concentrations volumiques ou ajustées pour la créatinine avaient été mesurées.

Les résultats montrent que l'exposition à ces pesticides est ubiquiste puisque plus de 90% des participants excrétaient les principaux métabolites de pyréthriinoïdes et pyréthrines à un niveau supérieur au seuil de détection analytique. Les résultats suggèrent que l'alimentation pourrait être à l'origine de ce niveau de base puisque les autres sources d'exposition connues n'ont été que rarement rapportées. Au Québec, l'exposition en milieu rural apparaissait légèrement plus importante qu'en milieu urbain et certains facteurs d'exposition, comme l'utilisation de pesticides domestiques, ont été rapportés plus fréquemment en milieu rural. Enfin, il a été démontré que la mesure des concentrations volumiques ou ajustées pour la créatinine de biomarqueurs est une approche qui peut entraîner des biais importants (jusqu'à 500% d'erreur et plus) en particulier lors de l'évaluation de l'exposition individuelle.

Il est évident que les autorités de santé publique et de santé environnementale employant des biomarqueurs urinaires afin d'évaluer l'exposition aux pyréthriinoïdes et aux pyréthrines (ainsi qu'à d'autres molécules ayant des demi-vies d'élimination similaire)

devraient diriger leurs efforts vers la mesure des quantités excrétées pendant une période d'au moins douze heures pour obtenir un portrait le plus valide possible de l'exposition. Il serait aussi souhaitable de mieux documenter la toxicocinétique de ces molécules chez l'humain afin d'établir avec une plus grande confiance la relation entre les quantités excrétées de biomarqueurs et les doses absorbées de ces contaminants.

Mots clés

biomarqueur, métabolite, neurotoxique, pesticide, quantité, santé environnementale, santé publique, urine

Summary

Pyrethroids and pyrethrins are neurotoxic insecticides also considered to have negative effects on the immune, endocrine and reproductive systems. They are abundantly used for agricultural and horticultural purposes, for pest control and to treat human and animal parasitic infestations (scabies, lice). Consequently, there is in environmental health an interest in evaluating the extent of human exposure to these pesticides. The measurement of pyrethroid and pyrethrin metabolites in urine seems to be the best approach because it provides in theory a global depiction of the exposure. Because of its straightforwardness, it is common practice to use the biomarkers volume-weighted or creatinine-adjusted concentrations in spot urine samples, however the validity of daily doses estimates derived from these units has yet to be assessed.

The main goal of this research was to develop, apply and validate a new approach to the measurement and analysis of biomarkers to improve the precision and the reliability of estimates of pyrethroid and pyrethrin exposure at the individual and population levels. The specific objectives were: i) to characterize human exposure to these contaminants in urban and rural populations in Quebec and ii) to assess the validity of this new strategy of measurement and analysis of urinary biomarkers with the biological monitoring strategies generally used to assess individual and population pyrethroid exposure and absorbed doses.

Adults and children recruited in the population of the Island of Montreal and of Monteregie collected their urines for at least twelve hours and filled a questionnaire about their potential sources of exposure. The amounts of pyrethroid and pyrethrin metabolites measured in urine (pmol) were adjusted to a fixed twelve hour period and for the body

weight. The amounts excreted in the urban area were compared to those from the rural area and individual and population data were compared to those that would have been obtained if volume-weighted or creatinine-adjusted concentrations would have been used.

Results show that exposure to these pesticides is very common, with more than 90% of the participants excreting the main pyrethroid and pyrethrin metabolites above the analytical limit of detection. These results also suggest that the diet could be the main contributor to this base level because the other known sources of exposure were rarely reported. In the province of Quebec, the exposure in a rural area seemed slightly more important than in an urban area and some exposure factors, like the use of household pesticides, were reported more frequently in rural area. Finally, it was shown that the measurement of volume-weighted or creatinine-adjusted concentrations is an approach that can lead to an important bias (an error of up to 500% and more) especially for the assessment of individual exposure.

It becomes obvious that public health and environmental health authorities using urinary biomarkers to assess pyrethroid and pyrethrin exposure (or other compounds with similar half-lives) should focus their efforts on measuring the amounts excreted during a period of at least twelve hours to obtain the best picture of the exposure. It would also be pertinent to increase the knowledge of the toxicokinetic behaviour of these compounds in humans in order to establish with greater confidence the relation between the excreted amounts and the absorbed doses of these contaminants.

Keywords

biomarker, metabolite, neurotoxic, pesticide, amount, environmental health, public health,
urine

Table des matières

Chapitre 1, Introduction	1
1.1 Les pyréthrinés et les pyréthrinés	2
<i>1.1.1 Origine</i>	2
<i>1.1.2 Structure chimique</i>	3
1.2 Sources d'expositions pour la population générale	7
<i>1.2.1 Alimentation</i>	7
<i>1.2.2 Autres sources</i>	10
1.3 Toxicité	13
<i>1.3.1 Études de toxicité in vitro</i>	13
<i>1.3.2 Toxicité chez l'animal</i>	17
1.3.2.1 Toxicité aiguë	17
1.3.2.2 Toxicité chronique	20
<i>1.3.3 Toxicité chez l'humain</i>	22
1.3.3.1 Toxicité aiguë	22
1.3.3.2 Toxicité chronique	27
1.4 Éléments de toxicocinétique des pyréthrinés et des pyréthrinés	29
<i>1.4.1 Composés parents et métabolites</i>	30
<i>1.4.2 Cinétique</i>	33
1.5 Évaluation de l'exposition	37
<i>1.5.1 Mesures ambiantes</i>	37
<i>1.5.2 Surveillance biologique et considérations spécifiques à l'utilisation de biomarqueurs urinaires</i>	38
1.6 Problématiques spécifiques	44
1.7 Objectifs général et spécifiques	45
Références	47
Chapitre 2, Les articles	58

Biological monitoring of exposure to pyrethrins and pyrethroids in a metropolitan population of the Province of Quebec, Canada _____ **59**

<i>Abstract</i> _____	60
<i>Introduction</i> _____	61
<i>Material and Methods</i> _____	64
<i>Results</i> _____	72
<i>Discussion</i> _____	80
<i>References</i> _____	87
<i>Contribution des auteurs</i> _____	91

Assessment of exposure to pyrethroids and pyrethrins in a rural population of the Montérégie area, Quebec, Canada _____ **93**

<i>Abstract</i> _____	94
<i>Introduction</i> _____	95
<i>Methods</i> _____	97
<i>Results</i> _____	105
<i>Discussion</i> _____	113
<i>References</i> _____	119
<i>Contribution des auteurs</i> _____	123

Comparaison de l'excrétion urinaire de biomarqueurs d'exposition aux pyréthrinoïdes et aux pyrétrines chez les résidents de régions urbaine et rurale de la Province de Québec, Canada _____ **125**

<i>Abstract</i> _____	126
<i>Abrégé</i> _____	127
<i>Introduction</i> _____	129
<i>Materiel et méthodes</i> _____	130
<i>Résultats</i> _____	135
<i>Discussion</i> _____	139
<i>Références</i> _____	143
<i>Contribution des auteurs</i> _____	144

**Concentrations versus amounts of biomarkers in urine: a comparison of
approaches to assess pyrethroid exposure pyréthrinoïdes _____ 145**

Abstract _____ 146

Background _____ 147

Methods _____ 150

Results _____ 158

Discussion _____ 167

References _____ 173

Contribution des auteurs _____ 181

Chapitre 3, Discussion générale _____ 182

Liste des tableaux

Tableau I. Résumé des résultats des analyses de résidus de pyréthriinoïdes effectuées dans les produits d'origine animale et végétale par l'Agence canadienne d'inspection des aliments pour l'année 2004-2005 _____	9
Tableau II. Métabolites des pyréthrines et des pyréthriinoïdes et leurs précurseurs _____	31
Tableau III. Études sur des travailleurs ou des membres de leur famille _____	40
Tableau IV. Études de la population générale (résultats publiés sans considérations sur le lieu de résidence) _____	41
Tableau V. Études comparant des populations de différents milieux _____	42

Liste des figures

Figure 1. Les 6 pyréthrinés extraites du *C. cinerariaefolium*_____ 4

Figure 2. Principaux pyréthrinoïdes dont l'usage est homologué au Canada (ARLA)___ 5

Figure 3. Biotransformation de la *trans*-perméthrine_____ 32

Liste des annexes

Annexe 1. Principaux insectes (ou autres organismes) cibles des différents pyréthri-noïdes et pyréthrinés employés au Québec_____xx

Annexe 2. Type de pyréthri-noïde et activité *in vitro* et *in vivo*_____xxi

Annexe 3. Type d'effets chez les rongeurs et d'autres animaux rapportés pour les pyréthri-noïdes utilisés au Québec_____xxii

Annexe 4. Résumé de la toxicocinétique des pyréthri-noïdes et des pyréthrinés chez l'humain_____xxiii

Annexe 5. Spectres infrarouge et de résonance magnétique nucléaire du CDCA_____xxiv

Liste des sigles

ACIA	Agence canadienne d'inspection des aliments
ADN	acide desoxyribonucléique
ALT	alanine aminotransférase
ARLA	Agence de réglementation de la lutte anti-parasitaire
C.	<i>Chrysanthemum</i>
CDC	Centers for disease control
CDCA	acide chrysanthémumdioïque
cDCCA	acide <i>cis</i> -3-(2,2-dichlorovinyle)-2,2-diméthylecyclopropanoïque
CIRC	Centre international de recherche sur le cancer (IARC en anglais)
CS	<i>choreoathetosis et salivation</i>
CSVD	canaux sodiques voltages dépendants
DBCA	acide <i>cis</i> -3(2,2-dibromovinyle)-2,2-diméthylecyclopropanoïque (DBCA)
DJA	dose journalière acceptable (ADI en anglais)
DRf	dose de référence (RfD en anglais)
FPBA	acide 4-fluorophénoxybenzoïque
hCE1, hCE2	<i>human carboxylesterase 1 et 2</i>
LD	limite de détection
OP	organophosphorés
PBA	acide phénoxybenzoïque
PBO	butoxyde de pipéronyle (piperonyl butoxide)
T	<i>tremor</i>
tDCCA	acide <i>trans</i> -3-(2,2-dichlorovinyle)-2,2-diméthylecyclopropanoïque
TSH	thyroestimuline
USEPA	<i>United States Environment Protection Agency</i>
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>

Liste des abréviations

%	pourcent
µg	microgramme
C ¹¹	carbone 11
Ca ²⁺	calcium
F ¹⁸	fluor 18
g	gramme
h	heure
kg	kilogramme
L	litre
mg	milligramme
min	minutes
mL	millilitre
N ¹³	azote 13
Na ⁺	sodium
nmol	nanomole
O ¹⁵	oxygène 15
pc	poids corporel
pmol	picomole
ppm	parties par million

xvii

pour mes enfants

Juliette, Éliane et Laurent

Remerciements

Je souhaite tout d'abord exprimer ma sincère gratitude à Michèle, ma directrice, qui m'a guidée au cours des 4 dernières années, qui m'a montré à écrire et avec qui j'ai eue de stimulantes discussions, que ce soit sur les statistiques ou sur les grossesses. Vient ensuite Gaétan, mon co-directeur qui fût le premier à m'accueillir dans son groupe, pour la rigueur scientifique avec laquelle il a lu tout ce que j'ai écrit et pour m'avoir donné confiance en moi en m'accordant la sienne.

Je me dois aussi de mentionner Nicole Leduc pour son cours de méthodologie de la recherche et pour m'avoir permis d'être tuteure dans ce cours. Kannan Krishnan, directeur de l'option pendant la plupart de mon temps au département, pour m'avoir permis d'assister au séminaire de toxicologie en guise de préparation à mon examen de synthèse et pour toujours avoir été de bon conseil. Caroline Couture et Claude Tremblay, pour la gestion du projet en Montérégie et Pierre Dumas, pour l'optimisation et la réalisation des analyses biochimiques. André Charrette, du département de chimie, pour la synthèse du CDCA, une molécule jamais mesurée en Amérique du Nord. Isabelle Gorse du Ministère du développement durable et de l'environnement pour tous les courriels échangés et pour toutes les précisions sur l'utilisation des pyréthrine et des pyréthriinoïdes au Québec.

Évidemment, il y a le Fonds de recherche en santé du Québec (FRSQ) qui, par la bourse de 3^e cycle qu'ils m'ont octroyée, m'a permis de me consacrer à mes études et à ma recherche. Il en va de même pour le programme de Ph.D. qui m'a octroyé une bourse de rédaction qui m'a permis de rédiger. Il y a également l'Institut national de santé publique (INSPQ) qui a

financé mon projet de recherche et fourni les ressources matérielles et humaines nécessaires à sa réalisation.

Puis, il y a ma mère, Marie-France, qui a toujours cru en moi, ma belle-mère, Murielle, qui a prodigué à mes enfants les meilleurs soins et mon beau-père, Claude, qui a pris la relève pendant un moment et qui a toujours été de bon conseil. Il y a enfin ma famille : mon mari, Charles, pour son support moral constant et mes enfants, pour m'avoir donné une raison de commencer et une raison de terminer.

Chapitre 1

Introduction

1. Introduction

1.1 Les pyréthrinines et les pyréthriinoïdes

Les pyréthrinines sont des insecticides d'origine végétale extraient des fleurs appartenant à la famille des marguerites (*Asteraceae*, genre *chrysanthemum*¹) alors que les pyréthriinoïdes sont des insecticides synthétiques dont la structure moléculaire comprend certaines des caractéristiques des pyréthrinines naturelles. Dans les prochaines lignes, l'origine et la structure chimique de ces molécules seront présentées.

1.1.1 Origine

La première utilisation des pyréthrinines est difficile à dater mais remonterait à plusieurs milliers d'années. Les pyréthrinines sont aujourd'hui principalement dérivées de la plante *Chrysanthemum cinerariaefolium* qui est abondamment cultivée en Afrique. Le terme « pyréthrinines » est employé au pluriel parce qu'il désigne le mélange des six molécules formant l'extrait naturel. Pour augmenter l'efficacité des pyréthrinines, elles sont utilisées en combinaison avec du butoxyde de piperonyle (Piperonyl butoxide (PBO), 5-[2-(2-butoxyethoxy)ethoxymethyl]-6-propyl-1,3-benzodioxole), un inhibiteur du Cytochrome P450. Utilisées en combinaison avec le PBO, les pyréthrinines sont très efficaces contre les insectes, mais étant photolabiles, leur persistance dans l'environnement est limitée.

Les pyréthriinoïdes, sont des insecticides de synthèse ayant un noyau structural similaire à celui des pyréthrinines mais qui, en général, se dégradent moins rapidement dans l'environnement et maintiennent donc leur efficacité pendant une période de temps accrue. Le premier pyréthriinoïde à avoir été commercialisé à titre d'insecticide a été l'alléthrine

¹ Certains taxonomistes classent désormais cette plante dans le genre *Tanacetum* et elle portait le genre *pyrethrum* dans une nomenclature précédente.

(Casida, 1980). L'alléthrine a été synthétisée en 1949 (Schechter *et al.*, 1949) alors que les pyréthrines étaient plus difficilement accessibles à cause de la guerre. Au cours des années 1960-1970, d'autres pyréthrinoïdes ont été développés dont la perméthrine, la cyperméthrine, la dècaméthrine et le fenvalérate (Casida, 1980). Ces quatre pyréthrinoïdes étaient les premiers à pouvoir être utilisés en agriculture et en santé publique parce qu'ils étaient plus résistants à la photodégradation. Depuis, de nombreuses autres molécules ont été synthétisées et l'utilisation des pyréthrinoïdes n'a fait que s'accroître – ainsi que le potentiel d'exposition humaine.

1.1.2 Structure chimique

Les pyréthrines, présentées à la figure 1, constituent un groupe de six molécules ayant un noyau structural commun formé d'un cyclopenténolone lié à un vinyle cyclopropane par un lien ester. Les pyréthrines portent trois centres chiraux qui sont importants pour la conformation spatiale de la molécule et leur activité au niveau de la cible cellulaire.

Les principaux pyréthrinoïdes homologués au Canada par l'Agence de réglementation de la lutte anti-parasitaire (ARLA) (ARLA, 2008) sont présentés à la figure 2. La stéréochimie n'est pas indiquée dans la figure parce que dans la plupart des cas, différents isomères peuvent se retrouver dans les formulations insecticides et à des ratios différents.

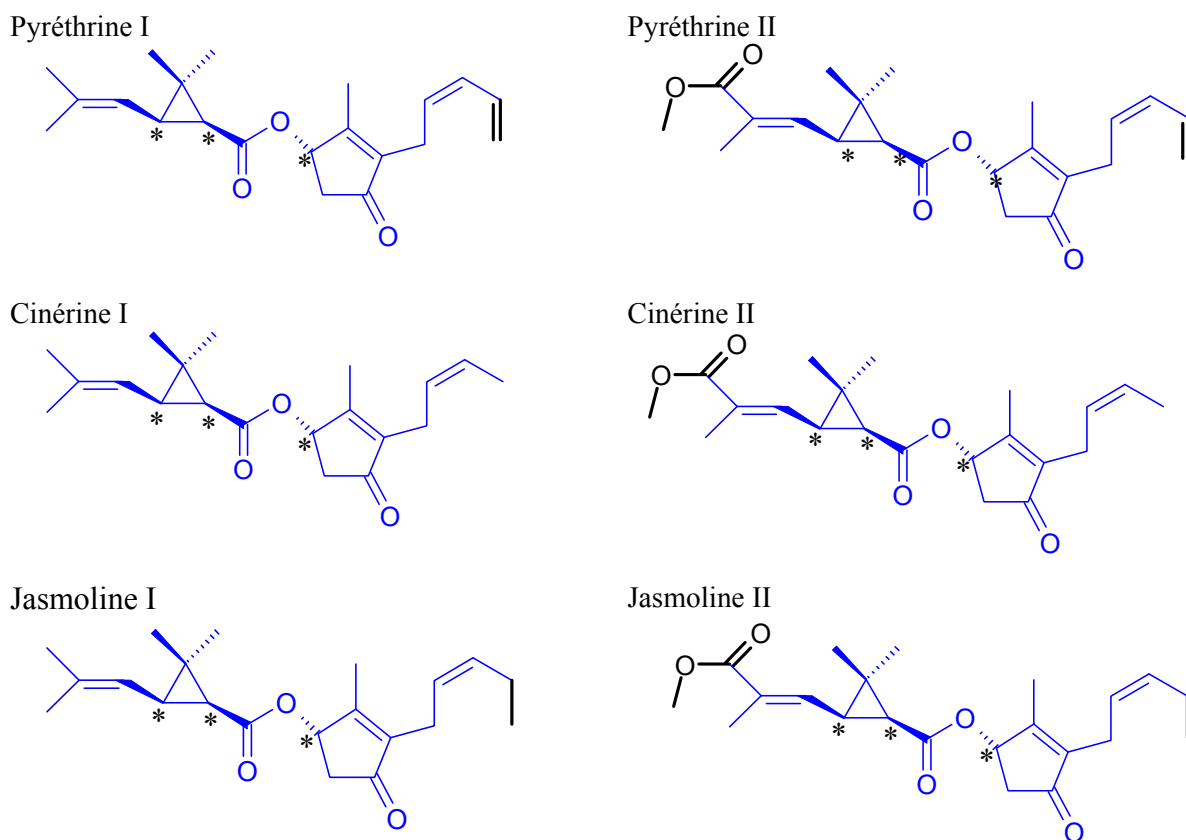
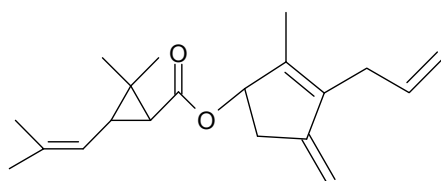


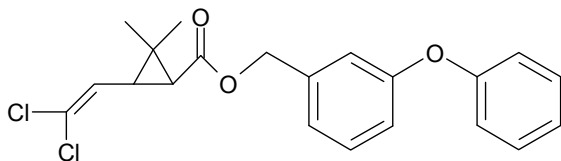
Figure 1. Les six pyréthrines extraites du *C. cinerariaefolium*. Le noyau structural commun est représenté en bleu. Les pyréthrines I (à gauche) n'ont pas de 2^e ester carboxylique sur le vinyle alors les pyréthrines II (à droite) en ont. Les groupements substituants qui différencient les six molécules sont représentés en noir (méthyle vs éthyle vs vinyle). Les centres chiraux sont identifiés par un astérisque.

Pyréthriinoïdes de type I

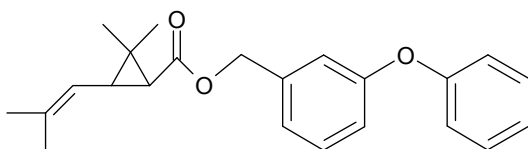
Alléthrine



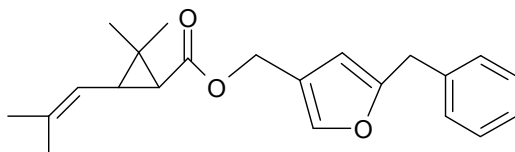
Perméthrine



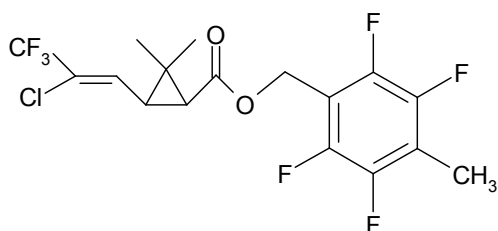
Phénothrine



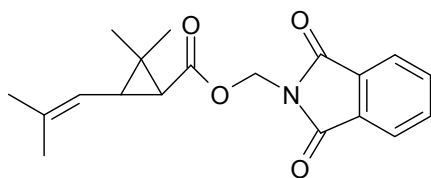
Resméthrine



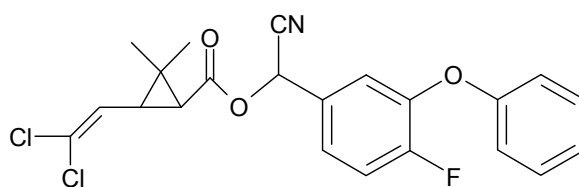
Tefluthrine



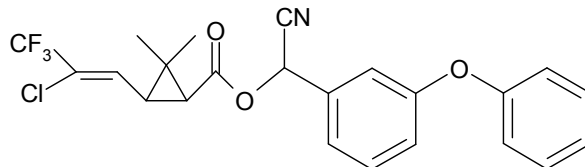
Tetraméthrine

Pyréthriinoïdes de type II

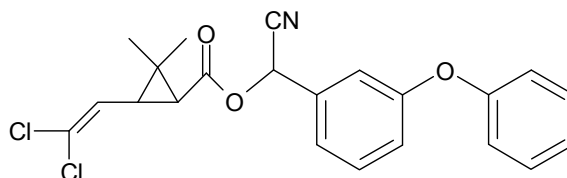
Cyfluthrine



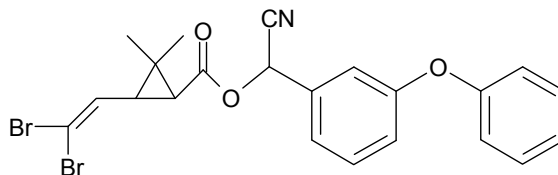
Cyhalothrine



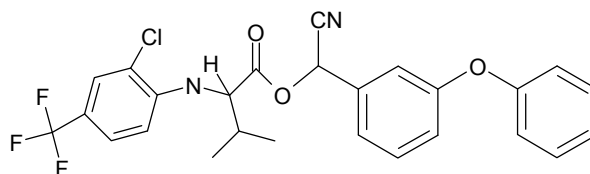
Cyperméthrine



Deltaméthrine



Fluvalinate



Tralométhrine

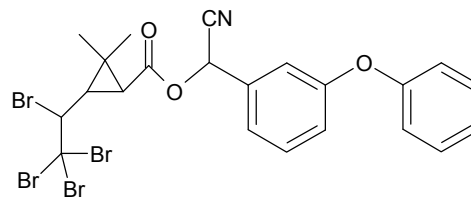


Figure 2. Principaux pyréthriinoïdes dont l'usage est homologué au Canada (ARLA). Les pyréthriinoïdes de type I n'ont pas de groupement nitrile en C α , alors ceux de type II en ont un.

Tout comme les pyréthrine, les pyréthrinoïdes ont des centres chiraux et des liens doubles qui entraînent la présence de plusieurs conformères. La spécificité isomérique des pyréthrinoïdes utilisés diffère d'une substance active à l'autre et différentes combinaisons d'isomères (formulations) sont possibles pour une même substance active. Par exemple, il est possible de trouver sur le marché de la *d-cis,trans*-alléthrine, de la *d-trans*-alléthrine et de l'alléthrine (un mélange de 8 stéréoisomères). La perméthrine et la cyperméthrine, pour ne nommer que les plus importants, se retrouvent habituellement dans un ratio *cis/trans* d'environ 40/60, mais ce ratio peut différer selon la formulation.

La forme isomérique (*cis* vs *trans*), tout comme la présence d'un nitrile en position $C\alpha$, influencent l'efficacité, le type d'effets produits et la biotransformation de ces molécules. La présence ou l'absence de groupement nitrile en $C\alpha$ est d'ailleurs un des critères utilisés par Lawrence et Casida (1983) pour diviser les pyréthrinoïdes en deux types distincts. Le type I est attribué à un pyréthrinoïde qui n'a pas de groupement nitrile en $C\alpha$, alors que si le pyréthrinoïde porte un nitrile en $C\alpha$, il sera de type II. Bien qu'utile conceptuellement, la classification en type I ou II est loin d'être parfaite, surtout pour les nouvelles molécules qui sont plus complexes et dont les effets *in vivo* ne sont pas toujours reliés à la structure chimique.

Puisque que cette dichotomie permet de reconnaître rapidement si la molécule porte un groupement nitrile en $C\alpha$, les pyréthrinoïdes seront classés selon leur type (I ou II) dans le reste de ce document.

1.2 Sources d'expositions pour la population générale

Tout comme la plupart des pesticides, il y a trois principales voies par lesquelles les pyréthrinés et les pyréthrinoïdes peuvent pénétrer dans le corps humain c'est-à-dire : par ingestion (directe ou indirecte), par contact cutané (direct ou avec des surfaces contaminées) et par inhalation de gouttelettes, de vapeurs ou de fumée. La prépondérance d'une voie de contact avec ces molécules *versus* une autre dépend du milieu dans lequel elles sont présentes (aliments, air, eau, sol) et du type d'occupation ou de comportement des individus concernés.

1.2.1 L'alimentation

Étant donné l'importance de leur utilisation en agriculture, une des principales sources d'exposition pour la population demeurant en milieu urbain serait la contamination des aliments (Heudorf et Angerer, 2001; Schettgen *et al.*, 2002).

Il est connu que l'emploi en médecine vétérinaire de pyréthrinoïdes contre les parasites chez le bétail peut induire des concentrations dans le lait de vache bien au-delà des niveaux recommandés (Sassine *et al.*, 2004), surtout si le temps d'attente entre le traitement et la récolte du lait à des fins de consommation n'est pas respecté. Le « pooling » du lait de centaines, voire milliers de vaches, dans l'industrie laitière réduit ces concentrations, mais si un grand nombre de vache excrète des pyréthrinoïdes dans leur lait, il est possible que la concentration dans le lait « mélangé » soit non négligeable. Les pyréthrinoïdes peuvent aussi se retrouver dans les muscles et par conséquent dans la viande.

Au Québec et ailleurs, les pyréthrinoïdes sont utilisées dans de nombreuses cultures et peuvent contaminer les fruits, les légumes, et les produits céréaliers (l'annexe 1 présente

une liste des insectes cibles pour les pyréthriinoïdes utilisés au Québec). Suite à une application, les agriculteurs doivent normalement respecter des temps d'attente précis avant d'effectuer une récolte afin de permettre une certaine dégradation des insecticides appliqués sur les cultures. Différentes formulations (concentré émulsifiable, poudre mouillable, suspension, granules, diffuseur de vapeur) et modes d'application (allant de l'applicateur portatif à l'épandage aérien) peuvent être utilisés selon le type de culture (champs à grande surface, verger, serre) et l'insecte en cause.

L'Agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA) effectue des analyses microbiologiques et chimiques sur des échantillons d'aliments. Le tableau I résume les résultats les plus récents disponibles pour les pyréthriinoïdes (ACIA, 2005). Selon ces données, une faible proportion des aliments testés montrait une concentration en pyréthriinoïdes plus élevée que les seuils de déclaration établis qui varient entre 0,017 et 0,064 ppm (mg/kg) selon le résidu et la matrice analysée (communication personnelle, DJ Grant, ACIA). Une proportion d'aliments beaucoup plus grande pourrait être contaminée, mais à des concentrations inférieures à ces seuils. La perméthrine et la cyperméthrine sont les pyréthriinoïdes les plus fréquemment détectés, possiblement à cause d'une utilisation abondante et d'une plus grande stabilité photochimique. Dans leur ensemble, ces données suggèrent que les aliments auxquels la population a accès peuvent effectivement présenter des niveaux résiduels de pyréthriinoïdes.

Tableau I. Résumé des résultats des analyses de résidus de pyréthriinoïdes effectuées dans les produits d'origine animale et végétale par l'Agence canadienne d'inspection des aliments pour l'année 2004-2005.

Produit	Nombre > seuil ^a	Nombre analysé	Résidus (nombre ^b)	Aliments
Fromage	0	35		
Produits laitiers importés	0	82		
Œufs et produits d'œufs				
domestiques	1	258	Deltaméthrine (1)	Œufs
importés	0	476		
Miel				
domestique	0	163		
importé	0	25		
Viande et produits (bœuf, poulet, canard, dindon, dinde, cheval, mouton, veau, porc et autres)				
domestiques	2	1745	Perméthrine (2)	vache, veau
importés	0	438		
Légumes et fruits frais				
domestiques	8	3080	Cyperméthrine (2) Perméthrine (6)	brocoli, choux, raisins, champignons, oignons, pêches, rutabaga.
importés	195	6759	Cyperméthrine(26) Cyfluthrine(2) Deltaméthrine(1) Esfenvalérate(3) Fenvalérate(3) Fenpropathrine(3) Perméthrine(157)	pomme, artichaut, asperges, avocat, choux de bruxelles, choux chinois, endives à large feuilles, goyave, kiwi, poireau, fruit longan, melon, orange, patate, tomate, laitue, fraises, carambole
Légumes et fruits modifiés				
domestiques	1	156	Perméthrine(1)	aliments destinés aux enfants
importés	6	354	Cyperméthrine(3) Perméthrine(3)	abricots séchés, kale en conserve, épinards en conserve, aliments destinés aux enfants

^a Nombre d'échantillons ayant une concentration plus grande que le seuil de déclaration qui varie de 0,017 à 0,064 ppm au Canada, selon le métabolite et la matrice analysés.

^b Nombre d'échantillons ayant, pour ce résidu particulier, une concentration plus grande que le seuil de déclaration

1.2.2 Autres sources

Dans un environnement urbain, les pyréthrinés et les pyréthrinoides sont utilisés pour le contrôle de nombreux insectes nuisibles (fourmis, blattes, etc.) dans les lieux de travail, dans la maison et dans le jardin. Les facteurs pouvant influencer l'importance de l'exposition sont principalement : le type d'application employée (endroits ciblés (craques), trappes, fumigation, vaporisation de grandes surfaces), la concentration et le volume appliqués, le type de surfaces traitées (lisses, poreuses, textiles) et le temps d'attente entre l'application et le retour sur les lieux. En milieu rural s'ajoute l'utilisation dans les champs, vergers et bâtiments avoisinants et pour la protection du bétail. La proximité de lieux d'application de pesticides peut entraîner une augmentation de l'exposition (Belleville *et al.*, 1997), possiblement en raison de la dérive aérienne.

Les pyréthrinoides peuvent persister pendant de longues périodes dans les habitations (Leng *et al.*, 2005). Ils se retrouvent dans une grande proportion des échantillons prélevés dans des appartements (Julien *et al.*, 2008) où ils sont liés à la poussière et sur les surfaces, dont celles servant à la préparation des aliments. Dans le cas particulier des enfants, l'ingestion indirecte peut devenir une source non négligeable puisqu'ils portent fréquemment leurs mains et des objets à leur bouche. C'est d'ailleurs ce que rapportaient Morgan *et al.* (2007) dans leur article portant sur l'exposition des enfants d'âge préscolaire, après avoir effectué un échantillonnage environnemental dans leurs lieux de résidence et dans leurs Centres de la petite enfance.

Comme les pyréthrinoides ne sont que très faiblement volatils, l'inhalation est habituellement jugée une source d'exposition peu importante dans la population générale. Il a tout de même été rapporté que des employés d'un bureau présentaient des symptômes

d'intoxication suite à l'introduction accidentelle de cyperméthrine dans un système de ventilation (Lessenger, 1992). L'utilisation de spirales contre les moustiques (Ramesh et Vijayalakshmi, 2001) et de vaporisateurs pourrait aussi être à l'origine d'une exposition par inhalation non négligeable aux pyréthriinoïdes.

Une autre source possible de contamination par inhalation serait le tabagisme. En effet, des pyréthriinoïdes peuvent être utilisés dans les cultures de tabac, dont la perméthrine et la deltaméthrine. Il a été rapporté que des résidus se trouvaient effectivement sur les plants et peuvent aussi se retrouver dans la fumée de tabac (Cai *et al.*, 2002). Des fumeurs avaient d'ailleurs des niveaux de métabolite (acide phénoxybenzoïque (PBA)) plus élevés que les non-fumeurs dans leurs urines (Riederer *et al.*, 2008).

Le contact cutané direct avec des pyréthriinoïdes peut avoir lieu lors de l'utilisation de pesticides domestiques ou pour le jardin. Le contact indirect peut avoir lieu avec des surfaces contaminées suite à l'utilisation de pesticides domestiques (à l'intérieur ou à l'extérieur) ou à la suite d'une extermination sur les lieux de travail ou dans la résidence.

L'utilisation de la perméthrine et d'autres pyréthriinoïdes à des fins vétérinaires ou médicales, tel que l'utilisation de shampoings ou de solutions contre les poux ou de traitements topiques contre la gale, peut entraîner une exposition aiguë par voie cutanée plus ou moins importante (Tomalik-Scharte *et al.*, 2005; van der Rhee *et al.*, 1989). Il en est de même lors de l'application de shampoings, de poudres ou de vaporisateurs sur des animaux domestiques. Dans le cas des poudres et vaporisateurs, il pourrait aussi y avoir inhalation de particules ou de gouttelettes, respectivement.

Une autre source d'exposition pourrait être l'utilisation de ces molécules à des fins de contrôle vectoriel. Aux États-Unis, les pyréthriinoïdes ont été vaporisés dans l'environnement immédiat des résidences, habituellement au moyen de camions, pour limiter les épidémies de maladies transmissibles par les insectes comme le virus du Nil occidental. Depuis son apparition en Amérique du Nord en 1996, les vaporisations se sont multipliées et pourraient contribuer à la présence de ces pesticides dans l'environnement. Les Centers for Disease Control (CDC) américains ont cependant rapporté qu'il n'y avait pas d'augmentation significative dans les niveaux de métabolites urinaires de pesticides mesurés avant et après une vaporisation contre le virus du Nil occidental dans différentes localités (n=83) (CDC, 2005a). À ce jour, il n'y aurait pas encore eu de telles vaporisations au Québec (communication personnelle, D. Bolduc, Institut national de santé publique du Québec (INSPQ)).

Chez les individus voyageant fréquemment, l'exposition aux pyréthriinoïdes peut aussi être accrue à cause de leur utilisation dans les avions (Berger-Preiss *et al.*, 2006). Ceci est particulièrement vrai dans le cas des employé(e)s des transporteurs aériens qui peuvent même être en charge de la *désinsectisation* des cabines de passagers (Gerry *et al.*, 2005; Sutton *et al.*, 2007).

En somme, ces données supportent l'idée que les pyréthriinoïdes sont ubiquistes et que l'exposition à ces molécules dans la population générale est probablement chronique. Dans certaines circonstances, une exposition aiguë à des niveaux plus élevés pourrait survenir comme lors du traitement d'infections parasitaires et des infestations. L'utilisation en agriculture et en élevage pourrait également entraîner une exposition plus grande chez les individus résidant en milieu rural. De plus, l'augmentation de l'utilisation des

pyréthrinoïdes consécutive à l'élimination graduelle de nombreux organophosphorés (OP) pourrait aussi contribuer à l'augmentation de l'exposition humaine aux pyréthrines et pyréthrinoïdes. Étant donné les sources multiples de pyréthrinoïdes et de pyréthrines, il est primordial de connaître les effets toxiques que ces molécules peuvent causer.

1.3 Toxicité

Les pyréthrinoïdes sont généralement considérés comme étant parmi les pesticides les plus sécuritaires, mais ceci est basé sur un nombre restreint d'études qui datent souvent du moment initial de leur homologation. Toutefois, les résultats d'études récentes de toxicité *in vitro* ainsi que des études cliniques et épidémiologiques soulèvent des questionnements relativement à la toxicité de ces substances. Nous présentons à la section suivante une revue de ces études.

1.3.1 Études de toxicité in vitro

Les pyréthrinoïdes et les pyréthrines sont des substances dites neurotoxiques c'est-à-dire que leur mode d'action implique des effets délétères sur le système nerveux. Ces effets peuvent être observés en laboratoire sur des cellules neuronales, mais d'autres systèmes peuvent aussi être affectés par ces molécules.

C'est au début des années 1980 que la toxicodynamique des pyréthrinoïdes dans le système nerveux a commencé à être élucidée. En utilisant l'axone géant du calmar, Narahashi (1982) a démontré que l'alléthrine et la tétraméthrine avaient des effets sur les canaux sodiques voltage-dépendants et ont présenté les premières données portant sur l'influence de la stéréochimie sur les effets exhibés. Depuis, les avancements en patch-clamp, en biologie moléculaire (clonage) et en culture cellulaire ont permis d'étudier les effets

spécifiques de ces molécules sur les canaux sodiques (cible principale) et d'établir leur impact sur d'autres canaux et récepteurs. Les mécanismes neurotoxiques de ces molécules ne sont toujours pas parfaitement établis et sont complexifiés par des affinités différentes envers les multiples cibles cellulaires des pyréthrinoïdes.

Dans une étude bien contrôlée, Choi et Soderlund (2006) ont rapporté que les 11 pyréthrinoïdes étudiés (alléthrine, bifenthrine, cisméthrine, cyfluthrine, cyhalothrine, cyperméthrine, deltaméthrine, fenpropathrine, fenvalérate, perméthrine et la téfluthrine) modifiaient la conformation de l'unité α de canaux sodiques voltages dépendants (CSVD) (normalement exprimés dans les ganglions de la racine dorsale qui contiennent les neurones afférents du système nerveux périphérique) de rats exprimés dans des oocytes de *Xenopus*. Ils affectaient aussi la cinétique d'activation et d'inactivation des canaux. Concrètement, il a été montré que le ralentissement ou l'empêchement de l'inactivation faisait en sorte que le canal pouvait retourner immédiatement dans un état « ouvert », ce qui pouvait provoquer le déclenchement de trains de potentiels d'action et expliquer certains symptômes. Il est à noter que l'isoforme des CSVD utilisé dans cette étude ne se retrouve que dans le système nerveux périphérique; d'autres isoformes de CSVD existent, entre autres dans le système nerveux central, et pourraient être affectés différemment.

Les pyréthrinoïdes ont des effets sur de nombreuses autres structures impliquées dans les mécanismes neuronaux dont principalement les canaux calciques, les récepteurs GABA et les canaux chlorures. Clark et Symington (2007) ont documenté l'effet de 11 pyréthrinoïdes (bioalléthrine, bifenthrine, cisméthrine, cyfluthrine, cyhalothrine, cyperméthrine, deltaméthrine, fenpropathrine, esfenvalérate, perméthrine et la tefluthrine) sur les canaux calciques dans des synaptosomes de rats. Utilisant la forme putative (sauvage, *wild-type*) et

un canal muté (thréonine → acide glutamique) mimant la forme phosphorylée du canal, les auteurs sont arrivés à la conclusion que les pyréthriinoïdes affectent les canaux calciques en modifiant le flux d'ions Ca^{2+} . L'effet dépendrait de l'état de phosphorylation du canal et du type de pyréthriinoïde; ces travaux peuvent donc en partie expliquer les différences observées dans les manifestations toxiques des deux types de pyréthriinoïdes.

Afin de comparer l'effet des deux types de pyréthriinoïdes sur les récepteurs GABA, Shafer et al. (2008) ont employé des *microelectrode arrays*. Dans cette approche, des cellules primaires sont cultivées dans un pétri dans lequel des microélectrodes (8-9 μm) sont incorporées afin d'enregistrer les potentiels d'action à l'extérieur des cellules. Sous les conditions d'expérimentation employées, il a été observé que la deltaméthrine (Type II) et la perméthrine (Type I) avaient des effets similaires bien que d'intensités différentes : la deltaméthrine étant plus efficace que la perméthrine. Les auteurs concluent donc que les différences observées *in vivo* dans les réponses toxiques aux deux types de pyréthriinoïdes ne pouvaient pas être attribuables aux effets sur les récepteurs GABA.

L'ensemble de ces données toxicodynamiques permettent d'expliquer en partie les mécanismes d'action de ces molécules sur le système nerveux. Cependant, d'autres types de données *in vitro* sont indicateurs d'autres effets pouvant être causés par les pyréthriinoïdes, comme celles obtenues lors des tests de génotoxicité et de perturbation endocrinienne.

Les tests de génotoxicité visent à évaluer si les substances d'intérêt peuvent entraîner des dommages à l'ADN ou la formation d'adduits, ces deux événements pouvant entraîner des

mutations. Selon des données récentes, les métabolites de la cyperméthrine pourraient former des adduits à l'ADN (Cui *et al.*, 2006). La perméthrine produirait aussi des adduits dans des cellules primaires de la muqueuse nasale (Tisch *et al.*, 2002), en particulier en présence de bioactivation. D'après des essais de type « comète », la deltaméthrine (Villarini *et al.*, 1998), la perméthrine et la cyperméthrine (Undeger et Basaran, 2005) pourraient causer des dommages à l'ADN. Toutefois, en 1995, Surralles *et al.* (1995) avaient exposé du sang complet et des cultures de lymphocytes humains à cinq pyréthriinoïdes et n'avaient observé qu'une faible augmentation de la fréquence des micronoyaux.

En ce qui a trait au potentiel de perturbation endocrinienne, il peut être observé en exposant des cellules ayant un gène rapporteur (luciférase) sous contrôle hormonal. Une diminution ou une augmentation de l'activité en présence de la substance d'intérêt suggère que le composé testé pourrait avoir des effets sur le développement pubère, sur certains cancers ou sur les fonctions reproductives. Des effets anti-androgéniques *in vitro* ont été rapportés pour la cyfluthrine (Zhang J *et al.*, 2008) et pour la perméthrine, la cyperméthrine et leur métabolite PBA (Sun *et al.*, 2007). La cyperméthrine influencerait aussi négativement la motilité des spermatozoïdes (Song *et al.*, 2008). Alors que Sumida *et al.* (2001) ont rapporté que huit pyréthriinoïdes ne se lient pas au récepteur à progestérone humain, Qu *et al.* (2008) rapporte que le fenvalérate inhibe la production de progestérone. Ces résultats ne sont pas contradictoires et indiquent simplement que l'action sur le système endocrinien se ferait bien en amont du récepteur. Par ailleurs, Tyler *et al.* (2000) ont rapporté qu'un des métabolites des pyréthriinoïdes, le PBA, présentait une activité estrogénique et antiandrogénique 100 fois supérieure à celle de la perméthrine. Ces données suggèrent

donc que les pyréthriinoïdes et/ou leurs métabolites pourraient agir en tant que perturbateurs endocriniens.

En bref, en dépit de quelques incongruités, ces résultats soulèvent des inquiétudes quant à l'innocuité initialement apparente de ces molécules ou de leurs métabolites chez l'humain et d'autres mammifères lors d'expositions à de faibles doses. Il est à noter que les effets observés *in vitro* ne sont pas toujours de bons indicateurs de ce qui peut se produire *in vivo*. Les études *in vitro* isolent souvent une partie d'un système et ne peut donc faire état des effets intégrés; elles omettent aussi fréquemment le métabolisme d'où l'importance de regarder les effets *in vivo*.

1.3.2 Toxicité chez l'animal

1.3.2.1 Toxicité aiguë

Les premières observations de toxicité aiguë des pyréthriinoïdes suite à de fortes doses chez l'animal suggéraient que les symptômes variaient en fonction de la molécule; les premiers pyréthriinoïdes avaient donc été classés selon le type de syndrome qu'ils provoquaient (Barnes et Verschoyle, 1974) : le syndrome T (*tremor*) étant associé à des tremblements et le syndrome CS (*Choreoathetosis and salivation*) consistant en des spasmes et des contorsions sinueuses et une salivation abondante. Ultérieurement, la classification « type I » et « type II » intégra aussi une caractéristique chimique : l'absence ou la présence respective d'un groupement nitrile C α . La plupart des pyréthriinoïdes provoquant le syndrome T étaient de type I et ceux provoquant le syndrome CS étaient de type II.

Certains éléments peuvent être dégagés de données d'exposition aiguë : l'exposition par voie orale nécessite une moins grande dose pour provoquer la mort que celle par voie cutanée et les effets suite à une exposition aiguë aux pyréthrinés et pyréthrinoïdes sont principalement de nature neurologique et peuvent aller jusqu'à la mort. Un tableau, présenté à l'annexe 2, résume les effets systémiques et leur type initialement rapportés chez l'animal suite à une exposition aiguë, ainsi que les effets mécanistiques sur les neurones et les DL₅₀ rapportées dans la littérature pour les différents pyréthrinoïdes utilisés au Québec.

Les données *in vitro* présentées précédemment indiquent que le fonctionnement de nombreuses cibles cellulaires différentes peut être affecté par les pyréthrinoïdes. Comme la spécificité de chaque molécule pour les différentes cibles (CSVD, canaux Ca²⁺, récepteurs GABA) varie, un continuum symptomatique d'effets sur le système nerveux, plutôt que des catégories bien définies de symptômes, peut être observé selon la ou les molécules en cause et leur dose.

Pour ces raisons, les effets associés à une faible dose de pyréthrinoïdes sont difficilement identifiables. Idéalement, pour analyser adéquatement la toxicité d'une substance, la causalité entre les effets toxiques observés et le composé d'intérêt doit être bien établie comme dans le cas de l'inhibition de l'acétylcholinestérase par les organophosphorés par exemple. Or, dans le cas des pyréthrinoïdes, les critères actuels d'intoxication sont des effets systémiques observés à fortes doses, puisque la diversité des mécanismes toxicodynamiques fait que les effets précoces sont probablement diffus et plus ou moins difficiles à déterminer, en particulier chez les animaux (troubles de coordination, maux de tête, étourdissements, problèmes de perception sensorielle...).

Dans cet ordre d'idée, Wolansky et Harrill (2008) ont effectué une recension des écrits sur l'utilisation d'effets neurocomportementaux chez l'animal, telles qu'une altération temporelle du contrôle opérant et une diminution de la préhension et de la coordination, comme effets cibles précoces de l'exposition aux pyréthriinoïdes. Les auteurs ont conclu qu'il y avait des différences significatives dues à l'exposition à de faibles doses effectives (effets précoces) de pyréthriinoïdes.

D'un point de vue toxicologique, une autre question importante est de savoir s'il y a additivité, supra-additivité ou antagonisme *in vivo*. Il avait déjà été rapporté que les pyréthriinoïdes provoquaient, chez le rat, une inhibition de l'excitabilité des cellules granulaires dans le gyrus denté de l'hippocampe (Joy *et al.*, 1989) et que la durée de l'inhibition dépendait du pyréthriinoïde étudié. Plus récemment, Ray *et al.* (2006) ont mesuré la durée de l'inhibition de l'excitabilité des cellules granulaires du gyrus denté de l'hippocampe en présence d'un seul (deltaméthrine) ou de deux pyréthriinoïdes (deltaméthrine et bioalléthrine) chez des rats sous anesthésie exposés de façon aiguë. Les auteurs rapportent ne pas avoir observé de différence significative dans la durée de l'inhibition en présence de deltaméthrine par rapport à la durée de l'inhibition en présence de deltaméthrine et de bioalléthrine. En d'autres termes, il n'y avait ni additivité, ni antagonisme entre la deltaméthrine (type II) et la bioalléthrine (type I) aux concentrations testées et dans les systèmes observés. Néanmoins, encore une fois, il s'agit ici d'un seul effet (la prolongation de l'inhibition de l'excitabilité des cellules granulaires) qui avait été mesuré alors que les recherches montrent que les effets sont diffus. L'absence d'interaction dans un système (type de canal vs un autre; système nerveux vs endocrinien) n'exclut pas la présence d'interactions dans un autre.

1.3.2.2 Toxicité chronique

Les études portant sur la toxicité chronique des pyréthriinoïdes chez l'animal ont fait l'objet de plusieurs recensions des écrits et ont été compilées par de nombreux organismes; un tableau en annexe 3 résume ces données qui remontent habituellement au moment de l'homologation des molécules. Typiquement, les doses utilisées sont telles qu'elles ne provoquent que peu ou pas d'effets de nature neurologique observables, comme les tremblements par exemple, chez les animaux à l'étude.

Dans ces recensions, les effets les plus rapportés sont une diminution du poids corporel, une augmentation de la taille et du poids du foie et quelques fois des reins. Ces effets, qui ne sont pas spécifiques aux pyréthriinoïdes, sont fréquemment observés lors de l'exposition d'animaux de laboratoire à une substance toxique. Les effets délétères sur les systèmes immunitaire, reproducteur et endocrinien et les cancers peuvent cependant être associés plus spécifiquement à l'action des pyréthriinoïdes, d'autant plus que les données *in vitro* présentées précédemment suggéraient que de tels effets soient possibles.

D'ailleurs, il est à noter qu'en 1999, le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC (IARC en anglais)) avait attribué le statut « non classifiable comme cancérigène chez les humains » à trois pyréthriinoïdes (perméthrine, deltaméthrine et fenvalérate). Toutefois, en 2006, l'EPA a classé la perméthrine dans la catégorie «*Likely to be Carcinogenic to Humans*». Dans les prochaines lignes, une mise-à-jour des études animales récentes concernant les effets non cancérigènes et cancérigènes des pyréthriinoïdes est présentée.

Chez le rat, Emara et Draz (2007) ont montré que l'exposition intermittente (trois fois par jour pendant deux, dix ou trente jours) à des pyréthrinoïdes en aérosol (canettes accessibles à la population générale) a provoqué des effets immunotoxiques. Lors de la comparaison avec les contrôles et selon le nombre de jours d'exposition, les effets significatifs observés allaient de la diminution du pourcentage de cellule CD4+CD8- et CD4+CD8+ dans la rate après deux jours d'exposition à une diminution de la fonction phagocytaire intrapéritonéale et de la réponse blastogène lymphocytaire après dix jours. Après trente jours, en plus des effets mentionnés ci-haut, il y avait aussi une perte de poids corporel et une diminution du poids de la rate.

Récemment, Zhang SY *et al.* (2008) rapportaient que la cyfluthrine (4 à 54 mg/kg/jour p.o. pendant sept jours) provoquait des effets délétères sur le système reproducteur mâle des rats tels qu'évalué par l'essai Hershberger. En particulier, ils ont observé, lors de la comparaison avec les animaux témoins, une diminution du poids des vésicules séminales, de la prostate et des glandes de Cowper aux doses de 18 mg/kg/jour et plus, sans toutefois avoir d'effets sur d'autres tissus (foie, reins, rate...) ou sur le poids corporel. Zhang SY *et al.* (2007) rapportaient par ailleurs que la perméthrine et plus particulièrement la *cis*-perméthrine avait des effets toxiques sur le système reproductif mâle murin (souris) et sur la biosynthèse de la testostérone. Plus spécifiquement, après six semaines de traitement à 35 ou 70 mg/kg/jour, la motilité et le nombre des spermatozoïdes étaient réduits; il y avait aussi diminution de la production de testostérone et une augmentation de la concentration de l'hormone lutéinisante (LH) sérique. Les recherches de Finch *et al.* (2006), quant à elles, démontrent que les pyréthrines provoquent l'élévation des niveaux de thyroïdostimuline (TSH). Ce faisant, les pyréthrines promeuvent la synthèse d'ADN dans les cellules folliculaires et l'induction de tumeurs thyroïdiennes. En effet, les effets sur le système

endocrinien sont souvent associés au développement ou à la progression des cancers parce que, dans de nombreuses formes de cancers, il y a surexpression de récepteurs hormonaux à la surface cellulaire ou induction de la production de protéines impliquées dans la multiplication cellulaire dont les gènes sont sous régulation hormonale. Dans l'ensemble, ces données suggèrent que, au-delà de certaines doses, les pyréthrine et les pyréthrinoïdes pourraient agir comme promoteur de cancers.

De plus, d'autres données récentes indiquent qu'ils pourraient aussi avoir un effet initiateur de cancer. C'est ce que Shukla *et al.* (2002) ont rapporté à propos de la cyperméthrine qui présentait un potentiel initiateur et promoteur chez des souris albinos; les doses auxquelles ces observations ont été réalisées étaient par contre très élevées (10 mg/kg). Price *et al.* (2007) ont démontré, dans une étude bien contrôlée, que les pyréthrine naturelles avaient un effet mitogène et pouvaient aussi induire les cytochromes CYP2B à la manière du phénobarbital. Ces effets du phénobarbital dans le foie sont associés aux mécanismes par lesquels cette molécule agit comme promoteur de cancers hépatiques à fortes doses chez les rongeurs (Whysner *et al.*, 1996). Ces recherches appuient l'hypothèse que les pyréthrine et les pyréthrinoïdes pourraient jouer un rôle dans le développement de cancers au-delà de certaines doses seuils.

1.3.3 Toxicité chez l'être humain

1.3.3.1 Toxicité aiguë

Deux types d'effets associés à une exposition aiguë aux pyréthrinoïdes chez l'humain sont possibles : des effets locaux, soit au site de contact avec l'insecticide, et des effets systémiques, soit au-delà du site de contact. La balance entre les effets locaux et

systemiques dépend principalement de la dose, du site d'absorption et de la distribution de la molécule à l'étude.

Les pyréthriinoïdes peuvent entraîner une toxicité locale à des doses de beaucoup inférieures à celles causant une toxicité systémique (Wilks, 2000). Du fenvalérate appliqué sur un lobe d'oreille chez 36 volontaires avait causé des sensations d'endormissement (de la peau), de brûlure, de picotement et des démangeaisons. Ces sensations se présentaient habituellement dans l'heure suivant l'application et atteignaient leur apogée après 3 à 6 h pour se résorber en dedans de 24 h (Knox *et al.*, 1984). Ces sensations, qui avaient déjà été rapportées par des travailleurs, peuvent être exacerbées par la chaleur, la lumière et le grattement (Tucker et Flannigan, 1983) mais être efficacement traitées avec de la vitamine E (Tucker *et al.*, 1984). Du point de vue mécanistique, la toxicité locale s'expliquerait par une excitation des terminaisons nerveuses sensorielles au site de contact avec l'insecticide (Wilks, 2000).

En plus des paresthésies (sensations d'engourdissement ou de picotements) – qui sont directement associées au mode d'action des pyréthriinoïdes – d'autres formes de toxicité locale ont été rapportées soit principalement l'irritation au site de contact, mais aussi des réactions allergiques. L'irritation, qui peut avoir lieu sur la peau, dans les voies respiratoires supérieures ou dans le tractus gastro-intestinal selon la voie d'exposition, consiste généralement en un prurit (démangeaisons) ou des picotements mais peut aller jusqu'à la brûlure et à l'apparition de cloques.

Dans une étude de cas rétrospective, Yang *et al.* (2002) ont compilé les dossiers de 48 cas d'ingestion de solution de perméthrine et les signes et symptômes locaux les plus souvent

rapportés étaient : maux de gorge, ulcérations buccales, dysphagie (gêne ou blocage lors de la déglutition), douleurs épigastriques et vomissements. Puisqu'il s'agit de données cliniques – donc pas proprement contrôlées –, il est cependant difficile de dissocier les effets dus aux pyréthriinoïdes de ceux attribuables aux autres composés chimiques présents dans les solutions.

Chez des travailleurs manipulant des plants traités au fenvalérate ou à la perméthrine, les signes et symptômes locaux ayant été rapportés lors d'entrevues avec un médecin ou une infirmière spécialisée en santé industrielle étaient les suivants : démangeaisons, brûlure, paresthésies, cloques et sécheresse pour la peau et l'écoulement nasal, les éternuements, la toux et la dyspnée (difficulté respiratoire) pour les voies respiratoires (Kolmodin-Hedman *et al.*, 1982). Des réactions allergiques topiques aux pyréthriinoïdes ont également été rapportées mais ne seraient que peu fréquentes tel que démontré par une étude de type clinique dans laquelle seulement 3 des 230 participants ont eu une telle réaction (Lisi, 1992).

En somme, lorsqu'un individu est exposé aux pyréthriinoïdes par voie cutanée, les effets toxiques subits lors d'une exposition de courte durée sont habituellement localisés au site de contact. Quand l'exposition se fait par d'autres voies, les effets locaux sont aussi ressentis mais dans ces circonstances, l'absorption peut être plus importante et ainsi provoquer des effets systémiques que nous aborderons dans les prochaines lignes.

Pour qu'une personne présente des signes et symptômes de toxicité aiguë systémique due aux pyréthriinoïdes, il faut que la dose absorbée soit relativement importante et les effets, ainsi que leur sévérité, dépendent de la molécule en question. Il a été rapporté dans la

littérature médicale qu'un homme, âgé de 45 ans, avait développé des convulsions avant de tomber dans le coma et de décéder dans les 3 h suivant l'ingestion accidentelle d'une solution à 10% de cyperméthrine (Box et Lee, 1996).

He *et al.* (1989) ont précisé que les cas d'intoxication aiguë chez les travailleurs font habituellement suite à de l'épandage à concentrations trop élevées, contre le vent, pendant de trop longues heures ou alors qu'une protection adéquate n'est pas utilisée. Les symptômes systémiques rapportés par ces auteurs, et qui étaient généralement précédés de symptômes locaux, variaient et incluaient : étourdissements, nausée, anorexie, fatigue, vomissement (après ingestion ou non), faiblesse, augmentation des sécrétions gastriques, pression à la poitrine, palpitations, modifications sensorielles (toucher, vision), sudation et fièvre. Dans les cas les plus sévères, se présentant habituellement après des accidents, les troubles rapportés sont : fasciculations musculaires (tressautement de fibres (faisceaux) musculaires involontaires), convulsions, modification de l'état de conscience, coma, œdème pulmonaire et mort.

Yang *et al.* (2002) avaient aussi observé une leucocytose (sans signes d'infection) chez 16 des 48 patients traités pour intoxication aiguë (par ingestion) à la perméthrine. Dans les cas les plus sévères, les symptômes pouvaient perdurer pendant quelques semaines, suggérant que la perméthrine peut entraîner des effets de nature immunologique chez l'humain. Par contre, Hadnagy *et al.* (2003) avaient rapporté une diminution statistiquement significative de certains marqueurs immunitaires dans un groupe de 61 individus suivis suite à l'application de pyréthriinoïdes à leur domicile. Plus spécifiquement, lors de l'utilisation du test de Friedman, il y avait une diminution statistiquement significative des paramètres suivants : la glycoprotéine acide α_1 , les immunoglobulines A et G et les lymphocytes CD3⁺.

Lors de l'utilisation du test de Wilcoxon, aux résultats précédents s'ajoutaient les immunoglobulines M, les lymphocytes C3c et C4, et les CD20⁺. De nombreux autres marqueurs étaient influencés à la baisse, mais de façon non statistiquement significative. Ces effets n'étaient cependant plus observés dans les bilans immunitaires réalisés 4 mois après l'application.

Suite à une étude de type clinique, Narenda *et al.* (2008) ont rapporté que des formulations d'alléthrine et de pralléthrine commercialement disponibles altéraient le profil biochimique plasmatique suite à une exposition aiguë (par inhalation de la fumée ou de vapeurs destinées à l'éloignement des moustiques) chez 24 sujets exposés en comparaison avec 12 contrôles pairés pour l'âge, le genre et l'alimentation. Les effets statistiquement significatifs étaient une augmentation du glucose, une diminution du cholestérol et du fer libre, une augmentation des triglycérides et des *very low density lipoprotein* (VLDL) ainsi qu'une augmentation en acides aminés libres. Dans leur étude initiale en 2007 (12 contrôles pairés avec 12 exposés), des effets délétères de ces mêmes pesticides au niveau des membranes érythrocytaires ont été rapportés (Narenda *et al.*, 2007). Cependant, il est à noter que ces études n'incluaient pas de contrôles intra-sujets et qu'il ne peut pas être exclu que les différences observées soient simplement dues à une variabilité naturelle dans les paramètres évalués.

Contrairement à l'inhibition de l'acétylcholinestérase par les OP qui peut être observée et mesurée *in vitro*, la plupart des signes et symptômes énumérés précédemment sont aspécifiques, c'est-à-dire qu'ils pourraient être attribuables à d'autres facteurs que les pyréthriinoïdes. Néanmoins, dans les cas humains d'intoxications aiguës sévères, les symptômes observés sont cohérents avec les données animales et les mécanismes

toxicodynamiques connus. Par exemple, les fasciculations musculaires, les convulsions, la modification de l'état de conscience, le coma et la mort peuvent être attribuables à une action sur les neurones efférents et sur le système nerveux central et sont comparables aux effets observés chez des animaux intoxiqués. Les paresthésies et modifications sensorielles peuvent s'expliquer par un effet sur les terminaisons nerveuses sensorielles (neurones afférents), mais sont difficilement mesurables chez les animaux. Les effets sur les systèmes cardiaque et pulmonaire pourraient aussi être cohérents avec une action des pyréthrinoïdes sur des canaux ioniques (calciques au niveau synaptique, calciques et sodiques au niveau cardiaque et sodiques au niveau pulmonaire).

1.3.2.2. Toxicité chronique

Tout comme chez les animaux, les effets consécutifs à une intoxication aiguë chez l'humain diffèrent fréquemment de ceux observés chez des individus exposés aux pyréthrinoïdes pendant de longues périodes. Cette toxicité peut être classée en différentes catégories : toxicité envers un système ou un organe donné, cancérogénicité, toxicité reproductive, etc. ; cependant, il n'y a que peu d'études portant sur la toxicité des pyréthrinoïdes pour des expositions chroniques à faibles doses chez l'humain. Quelques études ont été réalisées chez des travailleurs (i.e. des individus utilisant les pyréthrinoïdes dans le cadre de leur emploi) alors que d'autres l'ont été chez des individus dont l'exposition pouvait être caractérisée de « normale » (i.e. chez des personnes n'occupant pas un emploi nécessitant l'usage de pesticides).

Dans une étude comparant des individus sans exposition professionnelle aux pesticides à des travailleurs exposés (n=11), Desi *et al.* (1986) avaient observé que la fréquence d'aberrations dans le nombre de chromosomes par cellule était statistiquement plus élevée

chez ces derniers. Il est à noter que ces travailleurs utilisaient cependant d'autres pesticides en plus des pyréthriinoïdes.

Dans une étude de type cas (leucémie) – témoins dans laquelle l'utilisation de pesticides avait été compilée de façon rétrospective, Brown *et al.* (1990) rapportent que l'utilisation de pyréthrines était associée à l'augmentation de l'incidence de leucémies (sans considérations au type de leucémie) avec un rapport de cote de 3.7 (intervalle de confiance à 95% est 1,3-10,6). En d'autres termes, l'utilisation de pyréthrines était rapportée plus souvent chez les cas que chez les témoins. Cependant, comme ces individus utilisaient vraisemblablement d'autres substances, il est difficile d'attribuer sans réserve ces leucémies à l'utilisation de pyréthriinoïdes.

Dans une étude de cas, Doi *et al.* (2006) ont rapporté l'histoire d'une femme (44 ans) ayant développé une collection de symptômes se présentant comme la sclérose amyotrophique latérale (incluant fasciculations, faiblesse et atrophie musculaire). L'investigation a démontrée une exposition chronique aux pyréthriinoïdes en aérosol dans un endroit mal ventilé. Dans les mois suivant l'arrêt de l'exposition, ses fonctions neuro-motrices et thyroïdiennes s'étaient améliorées, supportant l'idée que les pyréthriinoïdes étaient à l'origine de ses symptômes. Il ne peut pas être exclu que des effets sous-cliniques soient induits à de plus faibles doses.

Dans une étude portant sur plus de 300 hommes infertiles, une association positive dose-dépendante a été rapportée entre la concentration urinaire en PBA et la concentration en spermatozoïdes avec des rapports de côtes (*odds ratio*) allant de 1,00 (non-significatif) à 1,31 (non-significatif), 1,73 (non-significatif) et 2,04 (intervalle de confiance à 95% de

1,02 - 4,09) pour les 1^{er}, 2^e, 3^e et 4^e quartiles, respectivement (Xia *et al.*, 2008). Bien que les rapports de cotes étaient non significatifs pour les 3 premiers quartiles (l'intervalle de confiance contenait la valeur « 1 »), ces observations suggèrent la présence d'une relation dose-réponse. Quelques mois auparavant, le même groupe avait rapporté des associations statistiquement significatives entre les niveaux urinaires de PBA (ajustés pour la créatinine) et les niveaux sériques d'hormone lutéinisante (augmentation) et d'estradiol (diminution) dans un groupe d'environ 200 hommes adultes présentant une infertilité inexplicée (Han *et al.*, 2008). Il est à noter toutefois qu'il s'agit d'une étude transversale, dans laquelle chaque patient n'a été évalué qu'une fois. Les concentrations urinaires de PBA n'ont pas été comparées à celles d'individus japonais fertiles et il n'est pas certain que ces résultats pourraient être répliqués.

1.4 Éléments de toxicocinétique des pyréthrinés et pyréthrinoïdes

L'utilisation de biomarqueurs urinaires à des fins de surveillance biologique de l'exposition requiert d'avoir certaines connaissances de base sur la toxicocinétique des composés d'intérêt. Dans un premier temps, il faut connaître quels sont les métabolites produits et excrétés dans l'urine, puis, plus les données toxicocinétiques sont complètes, plus il est possible de reconstruire de façon précise les doses qui ont été absorbées. Les données toxicocinétiques pour les pyréthrinés et les pyréthrinoïdes chez l'humain sont limitées à quelques études chez des volontaires et quelques études de cas d'intoxication dans lesquelles soit la cinétique urinaire, soit la cinétique sanguine sont présentées. Ces données portent surtout sur la cyfluthrine, la cyperméthrine et la perméthrine, dont les deux dernières sont parmi les pyréthrinoïdes les plus utilisés.

Étant donné le faible nombre de données humaines et de la qualité de celles-ci, il est nécessaire de se référer aux études animales et *in vitro* pour parvenir à interpréter la toxicocinétique. Dans les prochaines lignes, les principales études desquelles découlent les connaissances toxicocinétiques humaines pour ces insecticides seront présentées tout en appuyant certaines déductions sur des éléments provenant d'études animales et *in vitro* au besoin. Dans un premier temps, les molécules mères et les métabolites associés seront présentés puis suivra ensuite la présentation des données de cinétique urinaire et plasmatique.

1.4.1 Composés parents et métabolites

Comme dans le cas de nombreuses substances toxiques, les premières données disponibles quant à leur toxicocinétique proviennent des études de pré-homologation des molécules ou encore d'études indépendantes (Ueda *et al.* (1975), Casida *et al.* (1971) et Elliott *et al.* (1976), pour n'en nommer que quelques unes). Ces premières études ont notamment permis d'identifier quels étaient les métabolites produits et rapportaient qu'il y avait effectivement excrétion urinaire de ces métabolites. Le tableau II présente les métabolites urinaires des pyréthrinés et pyréthrinés mesurés, à ce jour, dans l'urine humaine ainsi que leurs composés parents.

Dans le cas des pyréthrinés, les données détaillées sur le métabolisme proviennent actuellement principalement d'études *in vitro* dans lesquelles des enzymes humaines (recombinantes) ou des fractions hépatiques humaines ont été mises en présence d'un pyréthriné afin de quantifier l'efficacité de la réaction de la biotransformation. D'une part, des carboxylestérases (hCE1 et hCE2) hydrolyseraient préférentiellement les pyréthrinés de type I ayant la configuration « *trans* » (Ross *et al.*, 2006) alors qu'un

mécanisme oxydatif serait généralement en cause pour les pyréthriinoïdes de type 1 de configuration « *cis* » (Scollon *et al.*, 2008). Ces derniers auteurs rapportent que le cytochrome CYP2C19 serait en mesure de métaboliser de nombreux pyréthriinoïdes de toute structure.

Tableau II. Métabolites des pyréthrinines et des pyréthriinoïdes et leurs précurseurs

Métabolites (abréviation)	Composé parent (précurseur)
Acides <i>trans</i> - et <i>cis</i> -3-(2,2-dichlorovinyle)-2,2-diméthylecyclopropanoïque (tDCCA et cDCCA)	Cyfluthrine, Cyperméthrine, Perméthrine
Acide phénoxybenzoïque (PBA)	Cyhalothrine-λ, Cyperméthrine, Deltaméthrine, Esfenvalérate*, Fenpropathrine*, Flucythrinate*, Fluvalinate, Perméthrine, Phénothrine
Acide chrysanthémumdioïque (CDCA)	Resméthrine, Alléthrine, Phénothrine, Pralléthrine, Tetraméthrine, Pyréthrinines naturelles (un mélange de : cinérine 1&2, jasmoline 1&2 and pyréthrine 1&2)
Acide <i>cis</i> -3(2,2-dibromovinyle)-2,2-diméthylecyclopropanoïque (DBCA)	Deltaméthrine
Acide 4-fluorophénoxybenzoïque (FPBA)	Cyfluthrine, Fluméthrine*

*Non homologué au Canada

La balance entre le type de métabolisme (hydrolytique ou oxydatif) dépendrait donc des molécules impliquées mais aussi de la présence relative de chacune des enzymes dans les différents tissus (foie, intestins, sang, etc.). Les pyréthriinoïdes sont constitués d'une partie aromatique ou cyclique liée par un lien ester à un vinyle cyclopropane plus ou moins substitué. Quelle que soit la voie enzymatique, les mêmes métabolites sont produits et proviennent de la scission de ce lien ester. Dans la plupart des cas, l'hydrolyse serait suivie d'une oxydation des métabolites. À titre d'exemple, la biotransformation de la *trans*-perméthrine est présentée à la figure 3. Les données actuelles indiquent que des estérases seraient en cause dans la biotransformation de la *trans*-perméthrine, mais les cytochromes pourraient aussi avoir un rôle à jouer.

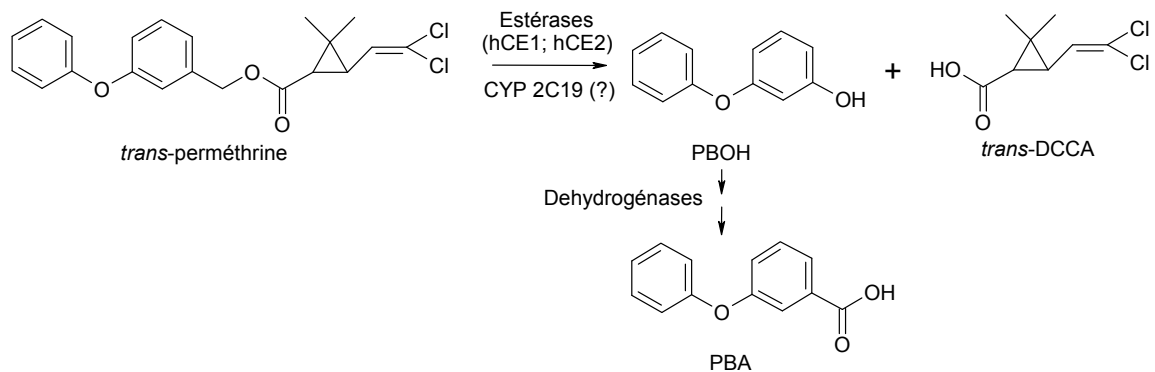


Figure 3. Biotransformation de la *trans*-perméthrine

Les métabolites produits sont ensuite conjugués; les données disponibles à ce sujet proviennent principalement d'études animales. La conjugaison peut en fait varier en fonction de la disponibilité des enzymes de phase 2 dans l'environnement du métabolite et de l'affinité de celles-ci pour ce dernier. Dans un chapitre sur le métabolisme des pyréthriinoïdes, Kaneko et Miyamoto (2001) rapportent que, chez l'humain, les métabolites peuvent subir une glucuroconjugaison, une sulfoconjugaison ou une

conjugaison aux acides aminés taurine et glycine. La glucuroconjugaison est présumée être la voie la plus importante pour la plupart des métabolites des pyréthrinoïdes chez les humains.

1.4.2 Cinétique

Les premières données de cinétique humaine pour les pyréthrinoïdes ont été publiées en 1983 alors que Eadsforth et Baldwin (1983) avaient évalué l'excrétion urinaire des métabolites chez des individus exposés de façon volontaire par voie orale à de la 1 :1 *cis* : *trans*-cyperméthrine. Les auteurs avaient rapporté que dans les 24 heures de collecte post-exposition, l'excrétion du *trans*-DCCA se faisait dans une plus grande proportion que celle du *cis*-DCCA soit 78% versus 49%. Quelques années plus tard, Eadsforth *et al.* (1988) ont réalisé une étude semblable avec des conditions d'exposition modifiées qui permettaient, selon eux, d'atteindre un état d'équilibre dynamique. Ils ont rapporté alors un pourcentage de la dose orale retrouvée dans l'urine sous forme de métabolites de 72% de l'isomère *trans* et 45% de l'isomère *cis* de la cyperméthrine dans les 24 heures suivant l'exposition.

Il est à noter que ces données de fraction de la dose d'exposition qui se retrouve dans l'urine ne permettent pas de déterminer la fraction d'absorption, puisque l'excrétion fécale chez ces volontaires n'a pas été documentée. L'excrétion fécale de plusieurs pyréthrinoïdes, sous forme de composé parent et de métabolites a seulement été observée chez les animaux (Kaneko et Miyamoto, 2001). Néanmoins, même si la fraction d'absorption et la fraction de la dose absorbée excrétée par voie urinaire ne peuvent pas être quantifiées par cette étude, il est tout de même possible de corrélérer la quantité excrétée dans les urines à celle qui a été ingérée. Il s'agit donc de savoir si l'isomère *cis* est excrété par voie urinaire dans une plus faible proportion parce que celui-ci est moins absorbé ou

bien parce que sa cinétique est plus lente et que l'excrétion n'est pas complète pendant la période d'observation (24 heures).

Les profils sériques de la *cis*- et *trans*- perméthrine obtenus pendant une période de neuf jours chez un individu ayant ingéré de façon volontaire environ 600 ml d'une émulsion de perméthrine à 20% (ratio *cis* : *trans* égal à 44 : 56) (Gotoh *et al.*, 1998) permettent de trouver une réponse à cette question. Suite à l'admission à l'hôpital, les concentrations plasmatiques maximales des deux isomères ont été atteintes entre 3 et 4 h post-ingestion et la concentration maximale de l'isomère *cis* était en fait plus élevée que celle de l'isomère *trans*. Ces données concordent avec les données obtenues par Anadon *et al.* (1991) qui rapportaient que le pic plasmatique avait lieu environ 4 heures après l'administration de la dose chez le rat.

Gotoh *et al.* (1998) rapportent des demi-vies de distribution similaires pour la *cis*- et la *trans*- perméthrine, mais aussi que l'élimination de l'isomère *cis* était considérablement plus lente que celle de l'isomère *trans*. En effet, à l'analyse des profils, les concentrations plasmatiques des isomères *cis*- et *trans*- diminuaient de façon parallèle pendant les premières heures. Cependant, la concentration de l'isomère *trans* devenait rapidement non détectable dans les premières 24 heures alors que la concentration de l'isomère *cis* diminuait que très lentement et demeurait quantifiable pendant plus de neuf jours. Ces données suggèrent qu'il y a un stockage adipeux et un relargage graduel de la *cis*-perméthrine. Ceci concorde avec les données de distribution tissulaire publiées par Crawford *et al.* (1981) pour la cyperméthrine et de Kim *et al.* (2008) pour la deltaméthrine. Kim *et al.* (2008) rapportaient également un stockage non-négligeable dans la peau et les muscles.

Les autres éléments de cinétique disponibles chez l'humain ont trait à l'absorption par les voies autres qu'orale tel que décrit précédemment. Tomalik-Scharte *et al.* (2005) ont estimé que la fraction de la dose se retrouvant dans les urines après une période de collecte infinie suite à une application topique d'une crème (étendue du corps, pendant 12 h) ou d'une solution (cuir chevelu, pendant 45 minutes) de perméthrine serait environ 0,5%. Une autre étude chez des patients atteints de gale a également montré une absorption cutanée également d'environ 0,5% pour la perméthrine (van der Rhee *et al.*, 1989). Selon les données de Eadsforth et Baldwin (1983), moins de 0,3 % de la dose cutanée appliquée sur l'avant-bras pendant 4 h se retrouverait dans les urines sous forme de métabolites.

Sur la base des observations faites par Eadsforth *et al.* (1988) notamment, on peut déduire qu'une forte proportion d'une dose absorbée de pyréthriinoïde est éventuellement excrétée par voie urinaire (au moins 45%). En effet, ces auteurs rapportaient que 72% d'une dose orale aiguë de *trans*-cyperméthrine et 45% d'une dose orale de *cis*-cyperméthrine (une molécule similaire à la perméthrine) se retrouvaient dans l'urine sous forme de DCCA dans les 24 heures suivant l'exposition,. Ainsi, la fraction absorbée d'une dose cutanée de pyréthriinoïdes devrait être de l'ordre de 1%.

Le taux d'absorption cutané serait donc très faible ce qui est cohérent avec les données publiées par Woollen *et al.* (1992) qui ont comparé l'excrétion urinaire des métabolites suite à une exposition orale ou cutanée à de la cyperméthrine. Considérant que Tomalik-Scharte *et al.* (2005) rapportent des fractions de dose excrétées dans les urines similaires suite à une exposition de 45 minutes sur le cuir chevelu et 12 heures sur la peau, on peut également déduire que l'absorption au cuir chevelu serait plus rapide. Il faut cependant

tenir compte que le véhicule différerait et que l'éthanol dans la solution dans l'étude de Tomalik-Scharte *et al.* avait peut-être pour effet de favoriser l'absorption.

L'autre voie d'absorption possible est l'inhalation. Les seules données toxicocinétiques pour cette voie chez l'humain portent sur la cyfluthrine. Leng *et al.* (1997) ont exposé des volontaires pendant 1 heure à $160 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de cyfluthrine. En moyenne, un total de $11,1 \mu\text{g}$ d'équivalents de cyfluthrine aurait été excrété; la quantité d'équivalents de cyfluthrine a été calculée à partir des quantités des métabolites acides *cis*-DCCA et *trans*-DCCA se retrouvant dans les urines. Considérant un taux respiratoire d'environ $0,7 \text{ m}^3/\text{h}$, on peut déduire qu'au moins 10% de la dose aurait été absorbée ($11,1 \mu\text{g} / (160 \mu\text{g}/\text{m}^3 \times 0,7 \text{ m}^3) \times 100\%$).

Malheureusement, dans la plupart des études chez des volontaires, ni le profil sanguin, ni l'excrétion fécale n'ont été mesurés ce qui rend impossible la détermination précise de la fraction de la dose absorbée excrétée dans les urines. Pour cette raison, seul un ordre de grandeur peut être établi pour les fractions d'absorption : au moins 50% d'une dose orale se retrouverait dans les urines, alors que ce pourcentage serait d'environ 10% lors de l'exposition par inhalation et environ 1% lors de l'exposition dermale. La vitesse d'absorption gastrique serait plus rapide que la vitesse d'absorption cutanée et l'isomère *trans* serait éliminé environ 10 à 15 fois plus vite que l'isomère *cis*, possiblement dû à un stockage adipeux de ce dernier et un relargage plus lent vers le sang. Ces différences pourraient aussi être attribuées en partie à un métabolisme plus efficace des isomères *trans* par rapport aux *cis*. L'annexe 4 présente un schéma conceptuel reliant ces différentes étapes de la toxicocinétique.

1.5 Évaluation de l'exposition

L'évaluation de l'exposition peut principalement être réalisée de deux façons soit, par la prise de mesure ambiante ou par surveillance biologique. Chaque approche a des limites et des avantages qui seront brièvement présentés dans les prochaines lignes.

1.5.1 Mesures ambiantes

L'évaluation de l'exposition à des substances toxiques comme les pyréthriinoïdes et les pyréthrinines peut se faire de nombreuses façons. Le monitoring ambiant consiste à mesurer les concentrations dans l'air inhalé et à tenir compte du temps passé dans le milieu, ou encore à mesurer les concentrations dans les aliments et à mesurer la quantité d'aliments ingérés par les sujets de l'étude. Pour des pesticides comme les pyréthriinoïdes, ces approches risquent d'être laborieuses et imprécises.

En effet, le monitoring ambiant à lui seul ne se prête pas bien à l'exposition au pyréthrinines et aux pyréthriinoïdes puisque les sources d'expositions sont trop diversifiées. Néanmoins, cette approche permet d'établir que les composés parents sont présents dans l'environnement. C'est d'ailleurs ce que Bradman *et al.* (2007) ont démontré en mesurant des pyréthriinoïdes dans des échantillons de surface et de poussières prélevés dans des résidences d'agriculteurs en Californie. L'exposition par voie alimentaire au Canada a aussi été évaluée par cette approche pour plusieurs pesticides dont certains organophosphorés (Rawn *et al.*, 2004). Cependant, afin d'être en mesure d'évaluer la charge corporelle, il faudrait connaître la fraction d'absorption pour chacune des voies ce qui n'est pas actuellement le cas et surtout être en mesure d'évaluer l'exposition par chacune des voies ce qui est pratiquement impossible pour des substances ubiquistes comme les pyréthriinoïdes

1.5.2 Surveillance biologique et considérations spécifiques à l'utilisation de biomarqueurs urinaires

La mesure d'indicateurs biologiques de l'exposition est une approche de choix pour évaluer l'exposition aux pesticides et est reconnue plus fiable que la prise de mesures ambiantes, notamment à cause de la grande incertitude sur la fraction de la dose d'exposition qui sera absorbée. Dans le cas spécifique des pyréthrinoïdes, les métabolites (présentés plus haut) sont mesurés dans les urines ce qui permet d'obtenir une indication de la dose absorbée de façon beaucoup plus efficace puisqu'elle intègre directement toutes les voies d'absorption; c'est d'ailleurs ce que rapportaient Barr *et al.*, (2007). Par ailleurs, il est possible d'effectuer des comparaisons entre les individus ou les populations.

Afin de pouvoir comparer les niveaux de biomarqueurs urinaires entre des individus, il est nécessaire d'utiliser une stratégie de mesure et d'analyse des résultats qui réduit le plus possible les incertitudes dans l'interprétation des résultats, c'est-à-dire qui assure que l'unité utilisée pour mesurer une substance dans l'urine (en équivalents molaires) est représentative de la fraction de la dose du composé parent qui a été absorbée. Par exemple, en théorie, si les biomarqueurs sont exprimés en concentrations ($\mu\text{g/L}$ d'urine ou nmol/L d'urine), les variations du volume urinaire influenceront les résultats. En effet, des facteurs intra- et inter-individuels peuvent entraîner la dilution ou la concentration de l'urine et de ses solutés (y compris les métabolites) dont : l'apport en liquide, la transpiration, le niveau d'humidité, le cycle menstruel, les variations circadiennes (Ryan *et al.*, 1961; Nakamura *et al.*, 1996; Singh *et al.*, 2000; Van Hoeck *et al.*, 2007). Le poids et l'âge des individus ainsi que les maladies (problèmes rénaux, diabète) peuvent également biaiser l'interprétation des résultats si les variations que ces facteurs peuvent induire ne sont pas adéquatement contrôlées.

Pour cette raison, de nombreux chercheurs effectuent un ajustement par la créatinine urinaire. Ils assument ainsi *a priori* que la créatinine est excrétée à un rythme constant alors qu'il a été démontré que de nombreux facteurs pouvaient influencer de façon intra- et inter-individuelle l'excrétion de la créatinine. Notamment, il est connu que l'activité physique, les variations circadiennes, l'âge, le sexe, l'indice de masse corporelle et la masse maigre chez les adultes, le sexe et la taille corporelle chez les enfants et l'apport protéique chez les enfants et les adultes (Calles-Escandon *et al.*, 1984; Singh *et al.*, 2000; Barr *et al.*, 2005; Mori *et al.*, 2006; Hellerstein *et al.*, 1988; Neubert et Remer, 1998; Kesteloot et Joossens, 1993) peuvent influencer l'excrétion de la créatinine.

L'usage d'échantillons urinaires ponctuels a d'ailleurs été remis en question dans le cas d'autres pesticides non-persistants (Arcury *et al.*, 2006 ; Barr *et al.*, 2006). La pertinence de la mesure des métabolites urinaires en concentrations volumiques ou ajustées pour la créatinine est aussi limitée parce que les données exprimées dans ces unités ne peuvent pas être comparées aux valeurs de références toxicologiques. En effet, ces valeurs sont exprimées en quantité par unité de poids corporel par jour et représentent un niveau d'exposition qu'il est souhaitable de ne pas dépasser pour limiter les effets sur la santé humaine. Certaines approches d'extrapolation ont été publiées (Fenske *et al.*, 2000; Mage *et al.*, 2004; Mage *et al.*, 2008) afin d'obtenir des valeurs quotidiennes à partir d'échantillons urinaires ponctuels mais la validité de ces approches n'a pas été vérifiée. Les tableaux suivants (III, IV et V) résument les principales études portant sur la surveillance biologique pour les pyréthrinoïdes en précisant la population à l'étude, le type de mesure, la taille de l'échantillon et les métabolites mesurés.

Tableau III. Études sur des travailleurs ou des membres de leur famille

Référence	Échantillon et localisation géographique (année de l'étude)	Type de collecte (unité de mesure)	Métabolites mesurés	Limite de détection (µg/L)	Étendue (µg/L)	Médiane (µg/L)
Panuwet <i>et al.</i> , 2008	136 fermiers en Thaïlande (2006)	Urine du matin (µg/L d'urine et µg/g de créatinine)	cDCCA	0,2	<LOD – 7,9	1,6
			tDCCA	0,4	<LOD – 44,5	<LOD
			PBA	0,1	<LOD – 42,6	<LOD
			FPBA	0,2	n.r.	n.r.
			DBCA	0,1	n.r.	n.r.
Wang <i>et al.</i> , 2007	78 and 66 exterminateurs au Japon (2004 – 2005)	Urine du matin (µg/L d'urine et µg/g de créatinine)	PBA	0,04	<LOD - 226	n.r.
Arcury <i>et al.</i> , 2007	60 enfants (1-6 ans) d'employés de ferme hispanophones en Caroline du Nord (2004)	Urine du matin (µg/L d'urine et µg/g de créatinine)	PBA	0,1	n.r.	0,07
Hardt et Angerer, 2003	36 employés de ferme, exterminateurs et employés de serre utilisant des insecticides en Allemagne (avant 2003)	Collecte de 24 h (µg/g de créatinine)	DCCA	0,5	<LOD – 92,4 ^a	n.r.
			DBCA	0,3	<LOD – 1,1 ^a	n.r.
			FPBA	0,5	<LOD – 0,8 ^a	n.r.
			PBA	0,5	<LOD – 57,5 ^a	n.r.
Leng <i>et al.</i> , 1996	20 exterminateurs en Allemagne (avant 1996)	Miction ponctuelle (µg/L d'urine)	DCCA	0,5	<LOD – 227 ^b	50 ^b
			FPBA	1		
			PBA	1		

^a µg/g de créatinine, données en µg/L non rapportées

^b valeurs rapportées seulement pour la somme de tous les métabolites mesurés.

n.r. non rapportée

Tableau IV. Études de la population générale (résultats publiés sans considérations sur le lieu de résidence)

Référence	Échantillon et localisation géographique (année de l'étude)	Type de collecte (unité de mesure)	Métabolites mesurés	Limite de détection (µg/L)	Étendue (µg/L)	Médiane (µg/L)
Leng <i>et al.</i> , 2006	45 sujets sans exposition connue en Allemagne (avant 2006)	Miction ponctuelle (µg/L d'urine)	CDCA	0,05	<LOD – 0,82	<LOD
			cDCCA	0,02	<LOD – 2,33	0,05
			tDCCA	0,02	<LOD – 3,35	0,17
			DBCA	0,02	<LOD – 0,18	0,04
			FPBA	0,01	<LOD – 0,02	<LOD
			PBA	0,02	<LOD – 3,06	0,26
CDC, 2005b	Environ 2500 individus de 6 à 59 ans résidant aux États-Unis (2000-2001)	Miction ponctuelle (µg/L d'urine et µg/g de créatinine)	cDCCA	0,1	n.r.	<LOD
			tDCCA	0,4	n.r.	<LOD
			DBCA	0,1	n.r.	<LOD
			FPBA	0,2	n.r.	<LOD
			PBA	0,1	n.r.	0,28
Heudorf <i>et al.</i> , 2004	673 enfants de moins de 18 ans demeurant à Frankfurt en Allemagne (1998)	Miction ponctuelle (µg/L d'urine)	cDCCA	0,1 ou 0,2	<LOD – 2,67	<LOD
			tDCCA		<LOD – 6,15	0,25
			DBCA		<LOD – 9,19	<LOD
			FPBA		<LOD – 1,35	<LOD
Baker <i>et al.</i> , 2000	130 adultes et enfants vivant aux États-Unis (avant 2000)	Miction ponctuelle (µg/L d'urine et µg/g de créatinine)	PBA	0,5	<LOD – 20,0	n.r.

n.r. non rapportée

Tableau V. Études comparant des populations de différents milieux

Référence	Échantillon et localisation géographique (année de l'étude)	Type de collecte (unité de mesure)	Métabolites mesurés	Limite de détection (µg/L)	Étendue (µg/L)	Médiane (µg/L)
Becker <i>et al.</i> , 2006	Enfants (1-17 ans) résidant en milieu urbain (103) ou rural (293) en Allemagne (2001-2002)	Urine du matin (µg/L d'urine et µg/g de créatinine)	cDCCA	0,1 µg/L	n.r.	0,11
			tDCCA	0,1 µg/L	n.r.	0,19
			DBCA	0,1 µg/L	n.r.	<LOD
			FPBA	0,1 µg/L	n.r.	<LOD
			PBA	0,1 µg/L	n.r.	0,29
Saieva <i>et al.</i> , 2004	Adultes résidant en milieu urbain (51) ou rural (18) en Italie	Collecte de 24 h (nmol/jour, sans correction pour la durée de collecte)	PBA	2,5 nmol/L	2,5-52,8 ^a	5,6 ^a

^a nmol/jour, concentrations non rapportées.

En somme, certaines conclusions importantes peuvent être tirées de ces études, notamment la population générale est probablement exposée de façon chronique aux pyréthriinoïdes et les habitants de régions rurales, dont les employés agricoles, pourraient être exposés à des niveaux plus élevés. Un des éléments détectés à l'observation de ces tableaux est que les limites de détection analytique associées à l'utilisation des biomarqueurs varient beaucoup d'une étude à l'autre. Comme il est coutume de remplacer les valeurs sous la limite de détection (LD) par la moitié de celle-ci pour effectuer des analyses descriptives ou comparatives (lorsque le pourcentage d'échantillons détectables est suffisamment élevé (>70%), une amélioration de la limite de détection fait en sorte qu'une plus petite proportion des individus présentent des niveaux non détectables de métabolites. Ainsi, ceux qui se voient attribuer comme concentration la valeur de 0,5 fois la LD sont moins nombreux et cette valeur (0,5 LD) est moins grande aussi. Selon la distribution réelle des concentrations de métabolites chez les individus sous la LD et la valeur même de cette LD, il peut y avoir sous estimation ou sur estimation des valeurs de tendance centrales calculées en employant ce proxy.

Aussi, tel que mentionné plus haut, l'expression des résultats en concentrations volumiques ou ajustées pour la créatinine plutôt qu'en quantité excrétée font que les mesures peuvent être influencées par le flux urinaire et le taux d'excrétion de la créatinine, respectivement, ce qui induit un niveau élevé d'incertitudes sur l'interprétation des résultats. Dans certains cas, les données sont exprimées sous forme d'excrétion quotidienne, mais la variabilité dans les durées de collection n'est pas présentée. À cause de ces limites, les conclusions auxquelles parviennent ces études peuvent être erronées.

1.6 Problématiques spécifiques

Tel que démontré précédemment, bien que la surveillance biologique de l'exposition soit probablement la méthode la plus adéquate pour évaluer l'exposition aux pyréthrines et aux pyréthriinoïdes. Jusqu'à présent, la grande majorité des données recueillies de cette façon l'ont été sur la base de mesures pouvant être biaisées par des variations dans le débit urinaire et dans le taux d'excrétion de la créatinine, ce qui en limite la validité. En revanche, ces données ont toutefois le mérite de montrer qu'une grande proportion de la population est exposée à ces substances neurotoxiques.

Or, pour ces pesticides, l'exposition de la population québécoise n'a jamais été documentée. Par ailleurs, l'exposition aux pesticides des individus demeurant en région rurale est suspectée d'être plus élevée que celle des individus demeurant en milieu urbain. Cependant, pour les raisons mentionnées plus haut, à notre avis, aucune étude n'a pu comparer de façon fiable l'exposition d'individus de régions urbaine et rurale. Par ailleurs, même si ces comparaisons avaient été valides pour leurs régions spécifiques (Allemagne par Becker *et al.* (2006) et Italie par Saieva *et al.* (2004)), il n'est pas certain que ces résultats auraient pu être applicables au Québec.

Puisque la surveillance biologique par la mesure de biomarqueurs urinaires est largement répandue et utilisée pour de nombreux produits toxiques en plus des pesticides d'intérêts dans la présente étude et considérant que les unités habituellement utilisées pour exprimer ces résultats sont possiblement influencées par la dilution urinaire et les variations dans l'excrétion de la créatinine, il apparaît important d'améliorer les stratégies de mesure et d'analyse de biomarqueurs urinaires.

1.7 Objectifs général et spécifiques

L'objectif général de ce projet était de développer, d'appliquer et de valider une nouvelle stratégie de mesure et d'analyse de biomarqueurs urinaires pour caractériser *adéquatement* l'exposition individuelle et populationnelle aux pyréthriinoïdes et aux pyréthrinines dans la population québécoise.

Les objectifs spécifiques sont :

- 1) De développer et d'appliquer une nouvelle stratégie de mesure et d'analyse des biomarqueurs urinaires pour caractériser adéquatement l'exposition aux pyréthriinoïdes et aux pyréthrinines d'adultes et d'enfants résidant au Québec dans une région urbaine (Montréal) et rurale (Montréal).
- 2) D'effectuer, à l'aide de cette nouvelle stratégie de mesure de biomarqueurs proposée, une comparaison de l'exposition de ces populations aux pyréthriinoïdes et aux pyréthrinines au cours de la période estivale.
- 3) De comparer la validité de la nouvelle stratégie de mesure et d'analyse de biomarqueurs urinaires proposée avec les autres méthodes plus usuelles utilisées pour estimer l'exposition individuelle et populationnelle et les doses absorbées de pyréthriinoïdes.

L'atteinte de ces objectifs a mené à la réalisation de quatre études dont les résultats sont publiés dans les quatre articles de la présente thèse :

l'article 1 : Biological monitoring of exposure to pyrethrins and pyrethroids in a metropolitan population of the Province of Quebec, Canada

l'article 2 : Assessment of exposure to pyrethroids and pyrethrins in a rural population of the Montérégie area, Quebec, Canada.

l'article 3 : Comparaison de l'exposition aux pyréthrinoïdes et aux pyréthrine chez les résidents de régions urbaine et rurale de la Province de Québec, Canada.

l'article 4 : Concentrations versus amounts of biomarkers in urine: a comparison of approaches to assess pyrethroid exposure.

Références

- ACIA (2005). *Rapport sur les pesticides, produits chimiques agricoles, médicaments vétérinaires, polluants environnementaux et autres impuretés dans les agroalimentaires.*, Agence canadienne d'inspection des aliments.
- Anadon A, Martinez-Larranaga MR, Diaz MJ et Bringas P (1991). *Toxicokinetics of permethrin in the rat.* Toxicol Appl Pharmacol **110**(1): 1-8.
- Arcury TA, Grzywacz JG, Barr DB, Tapia J, Chen H et Quandt SA (2007). *Pesticide urinary metabolite levels of children in eastern North Carolina farmworker households.* Environ Health Perspect **115**(8): 1254-60.
- Arcury TA, Quandt SA, Barr DB, Hoppin JA, McCauley L, Grzywacz JG et Robson MG (2006). *Farmworker exposure to pesticides: Methodologic issues for the collection of comparable data.* Environ Health Perspect **114**(6): 923-8.
- ARLA (2008). *Banque d'information sur les produits - étiquettes électroniques*, Agence de réglementation de la lutte anti-parasitaire - Santé Canada.
- Baker SE, Barr DB, Driskell WJ, Beeson MD et Needham LL (2000). *Quantification of selected pesticide metabolites in human urine using isotope dilution high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry.* J Expo Anal Environ Epidemiol **10**(6 Pt 2): 789-98.
- Barnes JM et Verschoyle RD (1974). *Toxicity of new pyrethroid insecticide.* Nature **248**(450): 711.
- Barr DB, Leng G, Berger-Preiss E, Hoppe HW, Weerasekera G, Gries W, Gerling S, Perez J, Smith K, Needham LL et Angerer J (2007). *Cross validation of multiple methods for measuring pyrethroid and pyrethrum insecticide metabolites in human urine.* Anal Bioanal Chem **389**(3): 811-8.
- Barr DB, Thomas K, Curwin B, Landsittel D, Raymer J, Lu C, Donnelly KC et Acquavella J (2006). *Biomonitoring of exposure in farmworker studies.* Environ Health Perspect **114**(6): 936-42.

- Barr DB, Wilder LC, Caudill SP, Gonzalez AJ, Needham LL et Pirkle JL (2005). *Urinary creatinine concentrations in the U.S. population: Implications for urinary biologic monitoring measurements.* Environ Health Perspect **113**(2): 192-200.
- Becker K, Seiwert M, Angerer J, Kolossa-Gehring M, Hoppe HW, Ball M, Schulz C, Thumulla J et Seifert B (2006). *GERES IV pilot study: Assessment of the exposure of german children to organophosphorus and pyrethroid pesticides.* Int J Hyg Environ Health **209**(3): 221-33.
- Belleville D, Boudreault D et Carrier G (1997). *Analyse des risques à la santé associés à l'exposition aux organophosphorés utilisés dans les vergers de la Montérégie.*, Direction de la santé publique de la Montérégie: 59.
- Berger-Preiss E, Koch W, Gerling S, Kock H, Klasen J, Hoffmann G et Appel KE (2006). *Aircraft disinsection: Exposure assessment and evaluation of a new pre-embarkation method.* Int J Hyg Environ Health **209**(1): 41-56.
- Box SA et Lee MR (1996). *A systemic reaction following exposure to a pyrethroid insecticide.* Hum Exp Toxicol **15**(5): 389-90.
- Bradman A, Whitaker D, Quiros L, Castorina R, Henn BC, Nishioka M, Morgan J, Barr DB, Harnly M, Brisbin JA, Sheldon LS, McKone TE et Eskenazi B (2007). *Pesticides and their metabolites in the homes and urine of farmworker children living in the Salinas Valley, CA.* J Expo Sci Environ Epidemiol **17**(4): 331-49.
- Brown LM, Blair A, Gibson R, Everett GD, Cantor KP, Schuman LM, Burmeister LF, Van Lier SF et Dick F (1990). *Pesticide exposures and other agricultural risk factors for leukemia among men in Iowa and Minnesota.* Cancer Res **50**(20): 6585-91.
- Cai J, Liu B, Zhu X et Su Q (2002). *Determination of pyrethroid residues in tobacco and cigarette smoke by capillary gas chromatography.* J Chromatogr A **964**(1-2): 205-11.
- Calles-Escandon J, Cunningham JJ, Snyder P, Jacob R, Huszar G, Loke J et Felig P (1984). *Influence of exercise on urea, creatinine, and 3-methylhistidine excretion in normal human subjects.* Am J Physiol **246**(4 Pt 1): E334-8.

- Casida JE (1980). *Pyrethrum flowers and pyrethroid insecticides*. Environ Health Perspect **34**: 189-202.
- Casida JE, Kimmel EC, Elliott M et Janes NF (1971). *Oxidative metabolism of pyrethrins in mammals*. Nature **230**(5292): 326-7.
- CDC (2005a). *Human exposure to mosquito-control pesticides - Mississippi, North Carolina, and Virginia, 2002 and 2003*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep **54**(21): 529-32.
- CDC (2005b). *Third national report on human exposure to environmental chemicals*. Atlanta (GA), Center for Disease Control and Prevention.
- Choi JS et Soderlund DM (2006). *Structure-activity relationships for the action of 11 pyrethroid insecticides on rat α 1.8 sodium channels expressed in *Xenopus* oocytes*. Toxicol Appl Pharmacol **211**(3): 233-44.
- Clark JM et Symington SB (2007). *Pyrethroid action on calcium channels: Neurotoxicological implications*. Invert Neurosci **7**(1): 3-16.
- Crawford MJ, Croucher A et Hutson DH (1981). *Metabolism of cis- and trans-cypermethrin in rats. Balance and tissue retention study*. J Agric Food Chem **29**(1): 130-5.
- Cui Y, Guo J, Xu B et Chen Z (2006). *Potential of chlorpyrifos and cypermethrin forming DNA adducts*. Mutat Res **604**(1-2): 36-41.
- Desi I, Dobronyi I et Varga L (1986). *Immuno-, neuro-, and general toxicologic animal studies on a synthetic pyrethroid: Cypermethrin*. Ecotoxicol Environ Saf **12**(3): 220-32.
- Doi H, Kikuchi H, Murai H, Kawano Y, Shigeto H, Ohyagi Y et Kira J (2006). *Motor neuron disorder simulating ALS induced by chronic inhalation of pyrethroid insecticides*. Neurology **67**(10): 1894-5.
- Eadsforth CV et Baldwin MK (1983). *Human dose-excretion studies with the pyrethroid insecticide, cypermethrin*. Xenobiotica **13**(2): 67-72.

- Eadsforth CV, Bragt PC et van Sittert NJ (1988). *Human dose-excretion studies with pyrethroid insecticides cypermethrin and alphacypermethrin: Relevance for biological monitoring.* Xenobiotica **18**(5): 603-14.
- Elliott M, Janes NF, Pulman DA, Gaughan LC, Unai T et Casida JE (1976). *Radiosynthesis and metabolism in rats of the 1R isomers of the insecticide permethrin.* J Agric Food Chem **24**(2): 270-6.
- Emara AM et Draz EI (2007). *Immunotoxicological study of one of the most common over-the-counter pyrethroid insecticide products in Egypt.* Inhal Toxicol **19**(12): 997-1009.
- Fenske RA, Kissel JC, Lu C, Kalman DA, Simcox NJ, Allen EH et Keifer MC (2000). *Biologically based pesticide dose estimates for children in an agricultural community.* Environ Health Perspect **108**(6): 515-20.
- Finch JM, Osimitz TG, Gabriel KL, Martin T, Henderson WJ, Capen CC, Butler WH et Lake BG (2006). *A mode of action for induction of thyroid gland tumors by pyrethrins in the rat.* Toxicol Appl Pharmacol **214**(3): 253-62.
- Gerry AC, Zhang X, Leng G, Inman AD et Krieger RI (2005). *Low pilot exposure to pyrethrin during ultra-low-volume (ULV) aerial insecticide application for control of adult mosquitoes.* J Am Mosq Control Assoc **21**(3): 291-5.
- Gotoh Y, Kawakami M, Matsumoto N et Okada Y (1998). *Permethrin emulsion ingestion: Clinical manifestations and clearance of isomers.* J Toxicol Clin Toxicol **36**(1-2): 57-61.
- Hadnagy W, Leng G, Sugiri D, Ranft U et Idel H (2003). *Pyrethroids used indoors--immune status of humans exposed to pyrethroids following a pest control operation--a one year follow-up study.* Int J Hyg Environ Health **206**(2): 93-102.
- Han Y, Xia Y, Han J, Zhou J, Wang S, Zhu P, Zhao R, Jin N, Song L et Wang X (2008). *The relationship of 3-PBA pyrethroids metabolite and male reproductive hormones among non-occupational exposure males.* Chemosphere **72**(5): 785-90.
- Hardt J et Angerer J (2003). *Biological monitoring of workers after the application of insecticidal pyrethroids.* Int Arch Occup Environ Health **76**(7): 492-8.

- He F, Wang S, Liu L, Chen S, Zhang Z et Sun J (1989). *Clinical manifestations and diagnosis of acute pyrethroid poisoning*. Arch Toxicol **63**(1): 54-8.
- Hellerstein S, Hunter JL et Warady BA (1988). *Creatinine excretion rates for evaluation of kidney function in children*. Pediatr Nephrol **2**(4): 419-24.
- Heudorf U et Angerer J (2001). *Metabolites of pyrethroid insecticides in urine specimens: Current exposure in an urban population in Germany*. Environ Health Perspect **109**(3): 213-7.
- Heudorf U, Angerer J et Drexler H (2004). *Current internal exposure to pesticides in children and adolescents in Germany: Urinary levels of metabolites of pyrethroid and organophosphorus insecticides*. Int Arch Occup Environ Health **77**(1): 67-72.
- Joy RM, Albertson TE et Ray DE (1989). *Type I and type II pyrethroids increase inhibition in the hippocampal dentate gyrus of the rat*. Toxicol Appl Pharmacol **98**(3): 398-412.
- Julien R, Adamkiewicz G, Levy JI, Bennett D, Nishioka M et Spengler JD (2008). *Pesticide loadings of select organophosphate and pyrethroid pesticides in urban public housing*. J Expo Sci Environ Epidemiol **18**(2): 167-74.
- Kaneko H et Miyamoto J (2001). *Pyrethroid chemistry and metabolism*. Handbook of pesticides toxicology. Krieger R, Ed. San Diego, Academic Press. **2**: 1263-88.
- Kesteloot HE et Joossens JV (1993). *Relationship between dietary protein intake and serum urea, uric acid and creatinine, and 24-hour urinary creatinine excretion: The BIRNH study*. J Am Coll Nutr **12**(1): 42-6.
- Kim KB, Anand SS, Kim HJ, White CA et Bruckner JV (2008). *Toxicokinetics and tissue distribution of deltamethrin in adult Sprague-Dawley rats*. Toxicol Sci **101**(2): 197-205.
- Knox JM, 2nd, Tucker SB et Flannigan SA (1984). *Paresthesia from cutaneous exposure to a synthetic pyrethroid insecticide*. Arch Dermatol **120**(6): 744-6.
- Kolmodin-Hedman B, Swensson A et Akerblom M (1982). *Occupational exposure to some synthetic pyrethroids (permethrin and fenvalerate)*. Arch Toxicol **50**(1): 27-33.

- Lawrence LJ et Casida JE (1983). *Stereospecific action of pyrethroid insecticides on the gamma-aminobutyric acid receptor-ionophore complex*. Science **221**(4618): 1399-401.
- Leng G, Berger-Preiss E, Levsen K, Ranft U, Sugiri D, Hadnagy W et Idel H (2005). *Pyrethroids used indoor-ambient monitoring of pyrethroids following a pest control operation*. Int J Hyg Environ Health **208**(3): 193-9.
- Leng G, Gries W et Selim S (2006). *Biomarker of pyrethrum exposure*. Toxicol Lett **162**(2-3): 195-201.
- Leng G, Kuhn KH et Idel H (1996). *Biological monitoring of pyrethroid metabolites in urine of pest control operators*. Toxicol Lett **88**(1-3): 215-20.
- Leng G, Leng A, Kuhn KH, Lewalter J et Pauluhn J (1997). *Human dose-excretion studies with the pyrethroid insecticide cyfluthrin: Urinary metabolite profile following inhalation*. Xenobiotica **27**(12): 1273-83.
- Lessenger JE (1992). *Five office workers inadvertently exposed to cypermethrin*. J Toxicol Environ Health **35**(4): 261-7.
- Lisi P (1992). *Sensitization risk of pyrethroid insecticides*. Contact Dermatitis **26**(5): 349-50.
- Mage DT, Allen RH, Gondy G, Smith W, Barr DB et Needham LL (2004). *Estimating pesticide dose from urinary pesticide concentration data by creatinine correction in the third national health and nutrition examination survey (NHANES-III)*. J Expo Anal Environ Epidemiol **14**(6): 457-65.
- Mage DT, Allen RH et Kodali A (2008). *Creatinine corrections for estimating children's and adult's pesticide intake doses in equilibrium with urinary pesticide and creatinine concentrations*. J Expo Sci Environ Epidemiol **18**(4): 360-8.
- Morgan MK, Sheldon LS, Croghan CW, Jones PA, Chuang JC et Wilson NK (2007). *An observational study of 127 preschool children at their homes and daycare centers in ohio: Environmental pathways to cis- and trans-permethrin exposure*. Environ Res **104**(2): 266-74.

- Mori Y, Hiraoka M, Suganuma N, Tsukahara H, Yoshida H et Mayumi M (2006). *Urinary creatinine excretion and protein/creatinine ratios vary by body size and gender in children.* Pediatr Nephrol **21**(5): 683-7.
- Nakamura S, Kobayashi Y, Tozuka K, Tokue A, Kimura A et Hamada C (1996). *Circadian changes in urine volume and frequency in elderly men.* J Urol **156**(4): 1275-9.
- Narahashi T (1982). *Modification of nerve membrane sodium channels by the insecticide pyrethroids.* Comp Biochem Physiol C **72**(2): 411-4.
- Narendra M, Bhatracharyulu NC, Padmavathi P et Varadacharyulu NC (2007). *Prallethrin induced biochemical changes in erythrocyte membrane and red cell osmotic haemolysis in human volunteers.* Chemosphere **67**(6): 1065-71.
- Narendra M, Kavitha G, Helah Kiranmai A, Raghava Rao N et Varadacharyulu NC (2008). *Chronic exposure to pyrethroid-based allethrin and prallethrin mosquito repellents alters plasma biochemical profile.* Chemosphere.
- Neubert A et Remer T (1998). *The impact of dietary protein intake on urinary creatinine excretion in a healthy pediatric population.* J Pediatr **133**(5): 655-9.
- Panuwet P, Prapamontol T, Chantara S, Thavornnyuthikarn P, Montesano MA, Whitehead RD, Jr. et Barr DB (2008). *Concentrations of urinary pesticide metabolites in small-scale farmers in Chiang Mai province, Thailand.* Sci Total Environ **407**(1): 655-68.
- Price RJ, Walters DG, Finch JM, Gabriel KL, Capen CC, Osimitz TG et Lake BG (2007). *A mode of action for induction of liver tumors by pyrethrins in the rat.* Toxicol Appl Pharmacol **218**(2): 186-95.
- Qu JH, Hong X, Chen JF, Wang YB, Sun H, Xu XL, Song L, Wang SL et Wang XR (2008). *Fenvalerate inhibits progesterone production through camp-dependent signal pathway.* Toxicol Lett **176**(1): 31-9.
- Ramesh A et Vijayalakshmi A (2001). *Monitoring of allethrin, deltamethrin, esbiothrin, prallethrin and transfluthrin in air during the use of household mosquito repellents.* J Environ Monit **3**(2): 191-3.

- Rawl DF, Cao XL, Doucet J, Davies DJ, Sun WF, Dabeka RW et Newsome WH (2004). *Canadian total diet study in 1998: Pesticide levels in foods from whitehorse, yukon, canada, and corresponding dietary intake estimates.* Food Addit Contam **21**(3): 232-50.
- Ray DE, Burr SA et Lister T (2006). *The effects of combined exposure to the pyrethroids deltamethrin and s-bioallethrin on hippocampal inhibition and skeletal muscle hyperexcitability in rats.* Toxicol Appl Pharmacol **216**(2): 354-62.
- Riederer AM, Bartell SM, Barr DB et Ryan PB (2008). *Diet and nondiet predictors of urinary 3-phenoxybenzoic acid in NHANES 1999-2002.* Environ Health Perspect **116**(8): 1015-22.
- Ross MK, Borazjani A, Edwards CC et Potter PM (2006). *Hydrolytic metabolism of pyrethroids by human and other mammalian carboxylesterases.* Biochem Pharmacol **71**(5): 657-69.
- Ryan WL, Luby RJ et Haller MJ (1961). *The relation of urine volume to the menstrual cycle and ovulation.* Fertil Steril **12**: 589-94.
- Saieva C, Aprea C, Tumino R, Masala G, Salvini S, Frasca G, Giurdanella MC, Zanna I, Decarli A, Sciarra G et Palli D (2004). *Twenty-four-hour urinary excretion of ten pesticide metabolites in healthy adults in two different areas of Italy (Florence and Ragusa).* Sci Total Environ **332**(1-3): 71-80.
- Sassine A, Moura S, Leo VM et Bustillos OV (2004). *Cypermethrin residues determination in the milk of a lactating dairy cow by gas chromatography-ion trap mass spectrometry.* J Anal Toxicol **28**(4): 238-41.
- Schechter M, Green N et Laforge F (1949). *Constituents of pyrethrum flowers. XXIII. Cinerolone and the synthesis of related cyclopentenolones.* Journal of the American Chemical Society **71**(9): 3165.
- Schettgen T, Heudorf U, Drexler H et Angerer J (2002). *Pyrethroid exposure of the general population-is this due to diet.* Toxicol Lett **134**(1-3): 141-5.

- Scollon ES, Starr JM, Godin SJ, Devito MJ et Hughes MF (2008). *In vitro* metabolism of pyrethroid pesticides by rat and human hepatic microsomes and cytochrome p450 isoforms. Drug Metab Dispos.
- Shafer TJ, Rijal SO et Gross GW (2008). Complete inhibition of spontaneous activity in neuronal networks in vitro by deltamethrin and permethrin. Neurotoxicology **29**(2): 203-12.
- Shukla Y, Yadav A et Arora A (2002). Carcinogenic and cocarcinogenic potential of cypermethrin on mouse skin. Cancer Lett **182**(1): 33-41.
- Singh R, Singh RK, Mahdi AA, Saxena SP, Cornelissen G et Halberg F (2000). Circadian periodicity of urinary volume, creatinine and 5-hydroxyindole acetic acid excretion in healthy Indians. Life Sci **66**(3): 209-14.
- Song L, Wang YB, Sun H, Yuan C, Hong X, Qu JH, Zhou JW et Wang XR (2008). Effects of fenvalerate and cypermethrin on rat sperm motility patterns in vitro as measured by computer-assisted sperm analysis. J Toxicol Environ Health A **71**(5): 325-32.
- Sumida K, Saito K, Ooe N, Isobe N, Kaneko H et Nakatsuka I (2001). Evaluation of in vitro methods for detecting the effects of various chemicals on the human progesterone receptor, with a focus on pyrethroid insecticides. Toxicol Lett **118**(3): 147-55.
- Sun H, Xu XL, Xu LC, Song L, Hong X, Chen JF, Cui LB et Wang XR (2007). Antiandrogenic activity of pyrethroid pesticides and their metabolite in reporter gene assay. Chemosphere **66**(3): 474-9.
- Surralles J, Xamena N, Creus A, Catalan J, Norppa H et Marcos R (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. Mutat Res **341**(3): 169-84.
- Sutton PM, Vergara X, Beckman J, Nicas M et Das R (2007). Pesticide illness among flight attendants due to aircraft disinsection. Am J Ind Med **50**(5): 345-56.
- Tisch M, Schmezer P, Faulde M, Groh A et Maier H (2002). Genotoxicity studies on permethrin, deet and diazinon in primary human nasal mucosal cells. Eur Arch Otorhinolaryngol **259**(3): 150-3.

- Tomalik-Scharte D, Lazar A, Meins J, Bastian B, Ihrig M, Wachall B, Jetter A, Tantcheva-Poor I, Mahrle G et Fuhr U (2005). *Dermal absorption of permethrin following topical administration*. Eur J Clin Pharmacol **61**(5-6): 399-404.
- Tucker SB et Flannigan SA (1983). *Cutaneous effects from occupational exposure to fenvalerate*. Arch Toxicol **54**(3): 195-202.
- Tucker SB, Flannigan SA et Ross CE (1984). *Inhibition of cutaneous paresthesia resulting from synthetic pyrethroid exposure*. Int J Dermatol **23**(10): 686-9.
- Tyler CR, Beresford N, van der Woning M, Sumpter JP et Thorpe K (2000). *Metabolism and environmental degradation of pyrethroid insecticides produce compounds with endocrine activities*. Environmental Toxicology and Chemistry **19**(4): 801-9.
- Ueda K, Gaughan LC et Casida JE (1975). *Metabolism of (+)-trans- and (+)-cis-resmethrin in rats*. J Agric Food Chem **23**(1): 106-15.
- Undeger U et Basaran N (2005). *Effects of pesticides on human peripheral lymphocytes in vitro: Induction of DNA damage*. Arch Toxicol **79**(3): 169-76.
- van der Rhee HJ, Farquhar JA et Vermeulen NP (1989). *Efficacy and transdermal absorption of permethrin in scabies patients*. Acta Derm Venereol **69**(2): 170-3.
- Van Hoeck K, Bael A, Lax H, Hirche H et van Gool JD (2007). *Circadian variation of voided volume in normal school-age children*. Eur J Pediatr **166**(6): 579-84.
- Villarini M, Moretti M, Pasquini R, Scassellati-Sforzolini G, Fatigoni C, Marcarelli M, Monarca S et Rodriguez AV (1998). *In vitro genotoxic effects of the insecticide deltamethrin in human peripheral blood leukocytes: DNA damage ('comet' assay) in relation to the induction of sister-chromatid exchanges and micronuclei*. Toxicology **130**(2-3): 129-39.
- Wang D, Kamijima M, Imai R, Suzuki T, Kameda Y, Asai K, Okamura A, Naito H, Ueyama J, Saito I, Nakajima T, Goto M, Shibata E, Kondo T, Takagi K, Takagi K et Wakusawa S (2007). *Biological monitoring of pyrethroid exposure of pest control workers in Japan*. J Occup Health **49**(6): 509-14.

- Whysner J, Ross P et Williams G (1996). *Phenobarbital mechanistic data and risk assessment: Enzyme induction, enhanced cell proliferation, and tumor promotion. Pharmacology and Therapeutics 71(1-2): 153-91.*
- Wilks MF (2000). *Pyrethroid-induced paresthesia--a central or local toxic effect? J Toxicol Clin Toxicol 38(2): 103-5.*
- Wolansky MJ et Harrill JA (2008). *Neurobehavioral toxicology of pyrethroid insecticides in adult animals: A critical review. Neurotoxicol Teratol 30(2): 55-78.*
- Woollen BH, Marsh JR, Laird WJ et Lesser JE (1992). *The metabolism of cypermethrin in man: Differences in urinary metabolite profiles following oral and dermal administration. Xenobiotica 22(8): 983-91.*
- Xia Y, Han Y, Wu B, Wang S, Gu A, Lu N, Bo J, Song L, Jin N et Wang X (2008). *The relation between urinary metabolite of pyrethroid insecticides and semen quality in humans. Fertil Steril 89(6): 1743-50.*
- Yang PY, Lin JL, Hall AH, Tsao TC et Chern MS (2002). *Acute ingestion poisoning with insecticide formulations containing the pyrethroid permethrin, xylene, and surfactant: A review of 48 cases. J Toxicol Clin Toxicol 40(2): 107-13.*
- Zhang J, Zhu W, Zheng Y, Yang J et Zhu X (2008a). *The antiandrogenic activity of pyrethroid pesticides cyfluthrin and beta-cyfluthrin. Reprod Toxicol 25(4): 491-6.*
- Zhang SY, Ito Y, Yamanoshita O, Yanagiba Y, Kobayashi M, Taya K, Li C, Okamura A, Miyata M, Ueyama J, Lee CH, Kamijima M et Nakajima T (2007). *Permethrin may disrupt testosterone biosynthesis via mitochondrial membrane damage of leydig cells in adult male mouse. Endocrinology 148(8): 3941-9.*
- Zhang SY, Ueyama J, Ito Y, Yanagiba Y, Okamura A, Kamijima M et Nakajima T (2008b). *Permethrin may induce adult male mouse reproductive toxicity due to cis isomer not trans isomer. Toxicology 248(2-3): 136-41.*

Chapitre 2

Les articles

Chapitre 2

Les articles

Biological monitoring of exposure to pyrethrins and pyrethroids in a metropolitan population of the Province of Quebec, Canada¹

Marie-Chantale Fortin^a, Michèle Bouchard^{a,b}, Gaétan Carrier^a, Pierre Dumas^c

^a Département de santé environnementale et santé au travail, Faculté de Médecine, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

^b Institut national de santé publique du Québec, 4835 Christophe-Colomb, Bureau 200, Montréal, Québec, Canada, H2J 3G8

^c Institut national de santé publique du Québec, 945 Wolfe, Sainte-Foy, Québec, Canada, G1V 5B3

Corresponding author:

Michèle Bouchard

Department of Environmental and Occupational Health, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Main Station

Montreal, Quebec, H3C 3J7, CANADA

Telephone: (514) 343-6111 ext 1640

Fax: (514) 343-2200

E-mail: michele.bouchard@umontreal.ca

¹ Article publié dans Environmental Research 2008, **107**(3) : 343-50.

Abstract

Pyrethroids and pyrethrins are neurotoxic insecticides widely used to control agricultural and domestic insect pests. The general population is potentially chronically exposed through food consumption, but the actual exposure is poorly documented in Canada. This study aimed at obtaining an indication of the absorption of those insecticides in residents of Montreal Island, the largest metropolitan area of the Province of Quebec, Canada. We randomly recruited 120 adults and 120 children aged 18-64 and 6-12 years old, of which 81 adults and 89 children completed the study. The absorption of pyrethroids and pyrethrins was assessed through measurements of six urinary metabolites: chrysanthemum dicarboxylic acid (CDCA), *cis*- and *trans*-2,2-(dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylic acids (cDCCA and tDCCA), *cis*-2,2-(dibromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylic acid (DBCA), 3-phenoxybenzoic acid (PBA) and 4-fluoro-3-phenoxybenzoic acid (FPBA). Metabolites were determined in 12-h urine collections for children and 2-consecutive 12-h collections for adults, and were analyzed by gas-chromatography/mass spectrometry. In both adults and children, the relative distribution of the various metabolites was as follows: tDCCA > PBA > cDCCA > CDCA > DBCA > FPBA. In adults, median (95th percentiles) cumulative amounts of these metabolites were 12.0 (231.1), 8.2 (177.9), 5.0 (110.1), 0.3 (8.2), 0.1 (4.7) and 0.1 (0.5) pmol/kg bw, respectively, in nighttime 12-h urine collections. Corresponding values in children were 12.6 (207.7), 10.2 (73.2), 5.1 (59.6), 2.1 (14.2), 0.1 (4.9) and 0.1 (0.8) pmol/kg bw. The main metabolites observed are indicative of exposure mainly to permethrin and cypermethrin and amounts absorbed are in the same range in adults and children. The distribution levels of the main metabolites in our sample also appeared similar to those reported in the US population.

Keywords: Pesticides; pyrethroids; biological monitoring; urine; biomarkers

Funding source: This study was supported by the Institut national de santé publique du Québec, Quebec, Canada.

Ethics approval: This study was approved by the Human Research Ethics Board of the Faculty of Medicine of the Université de Montréal.

1. Introduction

Pyrethroids and pyrethrins are widely used insecticides. Natural pyrethrins are compounds with insecticidal activity extracted from chrysanthemum flowers. Pyrethroids are synthetic compounds similar in structure to pyrethrins, which have been modified over the years to enhance their insecticidal activity and/or their persistence in the environment. In the Province of Quebec, Canada, they are registered for use on crops, cattle, domestic animals, for gardening, in commercial and domestic preparations against pests, and also for the treatment of human head lice and scabies (Gorse I., Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, personal communication). Pyrethroids are also among the pesticides considered by public health authorities in emergency responses to outbreaks of human cases of mosquito-borne diseases such as the West Nile Virus (Valcke et al., 2002). Thus, urban and peri-urban populations are potentially chronically exposed to pyrethroids through food consumption but exposure could also occur through indirect

ingestion, inhalation and dermal absorption mainly following domestic use of these pesticides.

The insecticidal activity of pyrethrins and pyrethroids mainly resides in their action on voltage-sensitive sodium channels in the nervous system (Soderlund et al., 2002). They do, however, elicit a number of effects that could also be mediated through their actions on voltage-sensitive calcium channels (Shafer and Meyer, 2004), or chloride-channels (Ray et al., 1997). Pyrethroids were documented to provoke tail currents that reflect delayed channel deactivation, as shown by voltage clamp in *Xenopus* oocytes expressing rat sodium channels (Choi and Soderlund, 2006). They also modify channels permeation allowing other ions to go through (Hille, 2001).

Sodium channels are somewhat well distributed throughout the animal world as they are shared (with some differences in the amino-acid sequence and structure) by numerous phyla, such as arthropods (insects) and chordates, the latter of which include human beings. Although generally considered among the safest pesticides due to their rapid biotransformation in humans, there are however some reports where exposure to pyrethroids has been linked to health effects in humans (Omalley, 1997; Muller-Mohnssen, 1999; Wilks, 2000; Bradberry et al., 2005). In animals and *in vitro* studies, effects such as endocrine disruption (Kim et al., 2005) and DNA modification (Undeger and Basaran, 2005) have also been described. These effects were however observed at relatively high levels.

Typically, pyrethroids are characterized by an ester bond that ligates a cyclic part to a vinyl cyclopropane derivative and this ester bond is cleaved during biotransformation. This metabolic process gives rise to a number of metabolites specific to that class of compounds, as shown in Table 1, which are eliminated in part in urine. According to Eadsforth and Baldwin (1983), 40 to 88% of a single oral dose of cypermethrin was excreted in the urine of volunteers during the first 24-h period post-dosing, depending on the isomer. In the study of Woollen et al. (1992), only 20 to 57% of an oral dose of the same molecule in volunteers was recovered in 120-h urine collections. Some other metabolites specific to individual pyrethroids or pyrethrins are likely produced; however, no method is currently available for their detection.

Table 1

Pyrethroids and pyrethrins and their corresponding metabolites

Metabolites	Parent compounds
<i>c</i> DCCA and <i>t</i> DCCA	Cyfluthrin, Cypermethrin, Permethrin
PBA	Cyhalothrin- λ , Cypermethrin, Deltamethrin, Esfenvalerate, Fenpropathrin, Flucythrinate, Fluvalinate, Permethrin, Phenothrin
CDCA	Resmethrin, Allethrin, Phenothrin, Prallethrin, Tetramethrin, Natural pyrethrins (a mix of: cinerin 1&2, jasmolin 1&2 and pyrethrin 1&2)
DBCA	Deltamethrin
FPBA	Cyfluthrin, Flumethrin

Surveys of exposure to pyrethroids in the general population have been carried out in a few countries such as Italy (Saieva et al., 2004), Germany (Schettgen et al., 2002; Heudorf and Angerer, 2001; Leng et al., 2006) and the US (CDC, 2005). However, no information is currently available regarding the population of the Province of Quebec or of other Provinces of Canada. Except in the study of Leng et al. (2006), the biomarkers

measured in urine for the biomonitoring of exposure to pyrethroids were a combination of the following metabolites: 3-phenoxybenzoic acid (PBA), 4-fluoro-3-phenoxybenzoic acid (FPBA), *cis*- and *trans*-2,2-(dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylic acids (cDCCA and tDCCA) and *cis*-2,2-(dibromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylic acid (DBCA). These metabolites do not represent exposure to five parent compounds, namely, allethrin, resmethrin, prallethrin, tetramethrin and the natural pyrethrins (the latter are in fact six different compounds generally present as a mixture). Leng et al. (2006) measured the chrysanthemum dicarboxylic acid (CDCA) to screen for exposure to those five compounds in a small non-professionally exposed population in Germany.

The objective of the present study was to obtain an indication of the overall daily absorption of pyrethroids and pyrethrins in a sample of the urban and suburban population of the Island of Montreal, through the measurements of all the above mentioned urinary metabolites.

2. Materials and methods

This study was approved by the Human Research Ethic Board of the Faculty of Medicine of the Université de Montréal. Each participant was met, at home, by a member of the research team to explain the protocol, the consent form and to provide the necessary material. All the participants gave their informed consent after receiving oral and written information on the goals, uses and implications of the study; in the case of children, the consent of a parent was obtained in addition to that of the participating child.

2.1. Study population

Adults aged between 18 and 64 years old and children aged between 6 and 12 years old were recruited among the general population of the Island of Montreal, in the Province of Quebec, Canada. The Montreal Island is the largest metropolitan area of the Province and the second in Canada with almost 1.85 million inhabitants in 2006 according to most recent census (Statistics Canada, 2007). The Island is constituted of urban and suburban areas.

The study was conducted in September 2005, beginning on August 30th and ending on the 3rd of October. Residents were randomly recruited by phone at their home, by the survey company SOM. Children aged between 6 and 12 years old were chosen rather than younger children because they are more likely to cooperate, yet most of them should not have undergone the physiological modifications that accompany the growth toward adulthood. Individuals with a liver or kidney disease or with cancer were excluded from the study, because these diseases can alter the metabolism and excretion of xenobiotics. Individuals professionally exposed to pesticides were also excluded.

2.2. Urine and data collection

Adult participants were asked to provide two consecutive \approx 12-h urine collections, i) a nocturnal collection starting from 6 p.m. until the next morning, including the first void upon waking (in a first bottle) and ii) a diurnal collection following first morning void until 6 p.m. (in a second bottle). Children were asked to provide a single \approx 12-h urine collection starting from 6:00 p.m. until the next morning (including the first morning void) to avoid the trouble of having kids collect their urine during daytime. All participants were invited

to write down on a questionnaire the time of their last void prior to the onset of urine collections as well as the time of the first and last collected micturitions to calculate total accumulation time. Urines were collected in high-density polypropylene Nalgene™ bottles and kept in the refrigerator by the participants. They were generally picked up within 48 h after collection by our research team, and kept frozen at -20°C until analysis.

The participants were also asked to provide information by questionnaire. A first questionnaire was administered by phone at the time of recruitment to verify eligibility of the subjects and to obtain sociodemographic information, such as gender, highest education level and household income. A second questionnaire, self-administered, aimed at documenting potential sources of exposure, the presence of possible confounding factors and information essential for our calculations, like age, weight and height. Both questionnaires were specifically adapted for the age group. Participants (or their parents) had to fill it on the day of the urine collection to avoid memory bias. Table 2 displays the different topics covered by each questionnaire. Questionnaires were validated before the beginning of the study.

Table 2

Data documented by questionnaire

Questionnaire 1 - Eligibility and sociodemographic status	Questionnaire 2 - Sources of exposure and potential confounding variables
- Age	- Time of urine collection (last urine voided prior to collection; beginning and end of urine collection)
- Diseases (renal or hepatic disease or cancer)	- Life habits and activities (drug and tobacco use ^a , alcohol consumption ^b , therapeutic treatments against head lice and activities)
- Exposure to pesticides at work ^a	- Extermination and pest control treatment
- Last completed level of education ^b	- Personal information (weight, height, age)
- Type of employment (sales person / retail trade / consumers services, blue collar, white collar, technician, manager, professional, student, other) ^b	- Average consumption of food groups (fruits and vegetables, dairy products, cereals, meat and substitutes) and consumption of certified organic food
- Total household income	

^a In the children questionnaire, it applied to the parents.

^b Not in the children questionnaire.

2.3. Urine analysis

Samples were sent frozen to the *Laboratoire de Toxicologie Humaine* of the *Institut national de santé publique du Québec* (INSPQ). Treatment of samples was conducted according to a method adapted from Leng et al. (2006). First, 5 ml of urine was transferred into a tube and isotope labelled internal standards were added (50 µl of ¹³C₆-PBA and ¹³C₄-tDCCA, 1 mg/l). The urine pesticide metabolites were deconjugated with 10 µl of β-glucuronidase in 5 ml of acetate buffer (pH = 5) for 16 h at 37°C. After acidification with 1 ml of concentrated hydrochloric acid, extraction was performed with 5 ml of dichloromethane and samples were shaken for 5 min and centrifuged for 5 min at 2000 g. The organic layer was separated and the extraction was carried out once more. The organic phases were pooled and evaporated to dryness. The residue was dissolved in 250 µl of

acetonitrile and derivatized with 30 μl of 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol and 20 μl of N,N-diisopropylcarbodiimide for 10 min at room temperature. For the extraction, 1 ml of NaHCO_3 1 M and 250 μl of hexane were added. Tubes were shaken for 10 min and then centrifuged for 5 min at 2000 g. The hexane layer was recovered and concentrated in a microvial to a final volume of 150 μl . Analysis was performed with an Agilent 6890N gas chromatograph (GC) equipped with a split/splitless injector, an Agilent 7683 autosampler, an Agilent XLB column (60 m length; 0.25 mm internal diameter; 0.25 μm film thickness) and coupled to an Agilent 5973N mass selective detector (MSD). The carrier gas flow was adjusted to 0.8 ml/min of helium (constant flow). The oven temperature program was ramped from 70°C (2 min hold time) to 200°C (4.6°C/min) (2 min hold time) then to 290°C (40°C/min) (5 min hold time). The injector and transfer line were kept at 275°C and 280°C, respectively. The volume of extract injected in pulsed splitless mode was 2 μl . The MSD was operated in selected ion monitoring (SIM) mode, using electron capture negative ionization with methane (99.97% purity) as the reagent gas and the ionization source temperature was set to 150°C and the quadrupole temperature to 103°C. The SIM masses and retention times are given in Table 3. The method performance parameters validated according to ISO-17025 criteria are listed in Table 4.

Table 3

Chromatographic and mass spectrometry parameters

Analytes	Retention time (min)	Relative retention time (min)	Target ion (Target)	Confirmation ion (Q ₁)	Ratio Q ₁ /target (%)
tDCCA- ¹³ C ₄	19.78	1.0000	329	331	31
tDCCA	19.85	1.0034	322	324	25
cDCCA	19.58	0.9900	322	358	12
PBA- ¹³ C ₆	32.34	1.0000	219	371	27
PBA	32.35	1.0003	364	213	47
CDCA	18.66	0.9434	498	499	17
DBCA	25.01	1.2645	368	366	101
FPBA	31.32	0.9683	231	382	88

Table 4

Performance parameters of the method

Analytes	Detection limit ^a (µg/l)	Limit of quantification ^b (µg/l)	Working range (µg/l)	Repeatability ^c (n = 10) (%)	Reproducibility ^d (n = 10) (%)	Recovery ^e (n = 3) (%)
tDCCA	0.0096	0.032	0.05 - 6	2.7	7.2	97
cDCCA	0.0072	0.024	0.05 - 4	3.6	6.4	92
PBA	0.013	0.043	0.05 - 10	3.5	5.0	93
CDCA	0.0088	0.029	0.05 - 10	5.5	8.7	37
DBCA	0.0060	0.020	0.05 - 10	4.1	8.1	92
FPBA	0.0053	0.018	0.05 - 10	3.6	5.0	89

^a Defined as 3 times the standard deviation from ten replicates of blanks spiked with pyrethroid metabolites levels ranging between 4 and 10 times the instrumental limit of detection, which is estimated to 3 times the signal to noise ratio.

^b Defined as 3.3 times the detection limit.

^c Precision for a given batch of analysis (same day, same calibration).

^d Essentially equivalent to the reproducibility except over a longer period of time (different days and different calibrations).

^e Percent recovery of normal urine spiked with 0.5 µg/l of standard.

2.4. Data analysis

Descriptive statistics were computed in Microsoft Excel and statistical analysis was performed in SPSS 13.0 for Windows from SPSS inc. (Chicago, IL). Whenever the metabolite concentration was below the analytical limit of detection (LOD), the value of half the LOD was attributed to that sample. To obtain the best possible indication of the actual daily absorbed dose of the exposed population, total amounts of metabolites excreted over a given period of time were used rather than volume-weighted or creatinine-adjusted concentrations. To render data comparable for statistical analysis, it was deemed essential to standardize the data for the two following factors. Amounts of metabolites excreted over the 12- or 24-h collection period were expressed per kg per body weight (pmol/kg bw) to correct for the large variations in the body weight from one individual to another. In addition, given that the total urine collection period varied from one participant to another, the duration of the collections was also adjusted on exact 12-h or 24-h periods by calculating the hourly excretion rate and by multiplying its value by 12 and 24, respectively. Descriptive data are further presented in μg of metabolite per liter of urine to ease the comparison with published data.

In addition, as a means of estimating the overall exposure to pyrethroids, a composite measure of metabolites was elaborated; for each subject, the total daily amounts of cyclopropane carboxylic acids (tDCCA, cDCCA, DBCA and CDCA) in pmol/kg bw were determined. In children, the daily (24-h) excretion of cyclopropane carboxylic acids was estimated by multiplying by 24 the hourly excretion rate calculated from nighttime collections (from 6 p.m. until the first morning void inclusively).

Statistical comparisons were made for the metabolites tDCCA, cDCCA, PBA and CDCA, on the basis of amounts in pmol/kg bw. Non parametric tests were used since some of our participants had high levels of metabolites which prevented us from having a normal or log-normal distribution, as verified by Shapiro-Wilk and Kolmogorov-Smirnov tests. Nonetheless, since the study aims at obtaining an indication of the actual population exposure, those subjects were considered in our statistical analysis. Due to the low levels of DBCA and FPBA observed in our groups and the high proportion of non-detectable values, these metabolites were not included in the statistical comparisons.

The amounts of each metabolite excreted in adults were compared with those observed in children using the Mann-Whitney U-test. Since children only provided nighttime collections, comparison with adults was conducted on the basis of nighttime collections. This test was also used to compare total daily (24 h) excretion of cyclopropane carboxylic acids (as estimated by the composite measurement) between adults and children. For these two populations, we established as well the correlations between the different metabolites levels, tDCCA, cDCCA, PBA and CDCA, using the Spearman correlation coefficient. In adults, the association between the sampling time (day versus night) and metabolites excretion was assessed on an intra-subject basis by the Wilcoxon sign test for related samples. Finally, the associations between metabolite levels and potential sources of exposure or confounding variables, for both adults and children, were evaluated using the Mann-Whitney U-test (when two groups were compared) or the Kruskal-Wallis test (when more than two groups were compared) for independent samples.

Participants who did not provide a full urine collection (missing either a full micturition or part of the morning void; 6 adults and 1 child) or those who furnished a single void (1 child) were not considered in the statistical analysis. Also, in three cases (2 children and 1 adult), major chromatographic interferences were observed, which prevented the quantification of some of their excreted metabolites; in these cases, all the metabolites except the missing one were considered in our analysis. Finally, in one participant, PBA level was about 100 times higher than that of the other metabolites, suggesting another source of exposure to PBA than pyrethroids. The PBA concentration from that participant was included in the descriptive statistics but was not considered for the other statistical analyses; the other metabolites from that same subject were nonetheless included.

3. Results

3.1. Sample population description

A total of 120 adults and 120 children initially agreed to participate in the study. This corresponds to a recruitment rate of 6% in adults (120 out of 2078 randomly generated phone numbers) and 11% in children (120 out of 1068 randomly generated phone numbers). For adults and children, respectively, the refusal rate was 33% and 16%, the inadmissibility rate was 1% and 36%, the non-response rate was 23% and 20%, and 35% and 15% of the generated numbers were either commercial or not in service. From the 240 eligible participants who initially agreed to participate in the study, 81 adults and 89 children provided urine samples, which corresponds to a total completing rate of a little above 70% (74% for children and 67.5% for adults).

Socioeconomic factors were documented for the sampled adult and children population and are presented in Table 5. All the documented factors, except for the sex distribution in adults, were similar to those obtained by the polling company SOM in 902 individuals of the general population of the Montreal Island through compilation of several surveys. Women appeared to be more willing to undertake the current type of study: they represented 65% of the adult sample of this study whereas they account for 51% of the general population.

Table 5
Characteristics of the study subjects

Variables	Adult sample (n = 120)	Child sample (n = 120)	Montreal adult population as surveyed by a polling company (n = 902)
<i>Gender (% female (n))</i>	65(78)	51(61)	51(460)
<i>Age (% (n))</i>			
18-24	8(10)	n.a. ^a	16(145)
25-34	27(32)	n.a. ^a	25(226)
35-44	33(40)	n.a. ^a	26(234)
45-54	20(24)	n.a. ^a	19(171)
55-64	12(14)	n.a. ^a	14(126)
<i>Highest educational level (% high school or less (n))</i>	25(30)	26(31)	27(244)
<i>Household income (% with income more than 45 000\$CAN/year (n))</i>	59(71)	59(71)	62(559)

^a n.a. = not applicable.

3.2. Pyrethroid and pyrethrin metabolites in urine

Tables 6-7 show the descriptive statistics on the total amounts adjusted for the body weight (pmol/kg bw) and concentrations ($\mu\text{g/l}$) of the different pyrethroid metabolites in the urine of adults and children, respectively. In adults, tDCCA, cDCCA and PBA were the most frequently detected metabolites (84 to 100% of the samples with detected values depending on the metabolites and time of urine collection). The metabolites FPBA, DBCA and CDCA were much less detected (4 to 43% of detection depending on the metabolites and time of urine collection). In children, tDCCA, cDCCA and PBA were, as in adults, the most frequently detected metabolites (94 to 97.6% of detection depending on the metabolites). Interestingly, CDCA was detected in higher proportion in children than in adults (75% vs 34% of the samples with detected values for nighttime collections). As for DBCA and FPBA, they were poorly detected (13 and 16% of detection, respectively) as was observed in adults.

In both adults and children, the distribution of the metabolite amounts per kg of body weight was as follows: tDCCA > PBA > cDCCA > CDCA > DBCA > FPBA. Amounts of each of the three main metabolites – tDCCA, cDCCA and PBA in pmol/kg bw – were not statistically different between adults and children ($p \geq 0.40$). However, the excreted amounts of CDCA per kg bw were statistically higher in children ($p < 0.001$).

Table 6

Detection rate, total amounts and concentrations of pyrethoid and pyrethrin metabolites in the urine of adults

Metabolites	n detected (%)	Amount (pmol/kg bw)							Concentration (µg/l)							
		min ^a	max	Percentiles					min ^a	max	Percentiles					
				5	25	50	75	95			5	25	50	75	95	
<i>tDCCA</i>																
Daily ^b	75(100)	<LOD	1143	<LOD	14	25	50	393	0.01	11.1	<LOD	0.15	0.25	0.48	3.48	
Daytime ^c	71(94.7)	<LOD	1199	1	7	12	23	123	0.01	11.0	0.01	0.10	0.21	0.44	1.69	
Nighttime ^d	75(100)	<LOD	888	<LOD	6	12	27	231	0.01	25.0	<LOD	0.17	0.24	0.54	3.82	
<i>cDCCA</i>																
Daily	72(96.0)	<LOD	697	2	4	9	20	173	0.007	4.3	0.02	0.05	0.10	0.20	1.51	
Daytime	64(84.2)	<LOD	730	<LOD	2	4	9	65	0.007	6.7	<LOD	0.03	0.07	0.18	0.68	
Nighttime	71(94.7)	<LOD	338	1	2	5	12	110	0.007	8.2	0.02	0.06	0.12	0.23	1.69	
<i>PBA</i>																
Daily	73(98.7)	<LOD	1091	3	9	17	52	312 ^f	0.01	15.5	0.03	0.09	0.17	0.41	4.23 ^f	
Daytime	69(92.0)	<LOD	693	1	4	9	20	105	0.01	9.6	<LOD	0.07	0.16	0.39	2.40	
Nighttime	72(96.0)	<LOD	1010 ^e	1	4	8	22	178	0.01	24.0 ^e	0.03	0.10	0.19	0.49	4.18	
<i>CDCA</i>																
Daily	32(42.7)	<LOD	46	<LOD	<LOD	<LOD	4	15	0.009	0.44	<LOD	<LOD	<LOD	0.04	0.15	
Daytime	22(28.9)	<LOD	18	<LOD	<LOD	<LOD	1	11	0.009	0.62	<LOD	<LOD	<LOD	0.03	0.16	
Nighttime	26(34.7)	<LOD	8	<LOD	<LOD	<LOD	1	8	0.009	0.68	<LOD	<LOD	<LOD	0.04	0.31	
<i>DBCA</i>																
Daily	10(13.3)	<LOD	12	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	8	0.006	0.15	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.14	
Daytime	7(9.2)	<LOD	13	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	2	0.006	0.17	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.08	
Nighttime	7(9.3)	<LOD	5	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	5	0.006	0.27	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.14	
<i>FPBA</i>																
Daily	9(12.0)	<LOD	2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	1	0.005	0.05	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.02	
Daytime	3(4.0)	<LOD	2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.005	0.06	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	
Nighttime	7(9.3)	<LOD	1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	1	0.005	0.10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.03	

^a In all the cases, the minimum is equal to the limit of detection (LOD).^b ≈ 24 h collection.

^c ≈12 h collection starting after the first morning void until ≈ 6 pm.

^d ≈12 h collection starting from ≈ 6 p.m. until the next morning, including first morning void.

^e One subject had a very high PBA level with no increase in the other metabolites suggesting another source of exposure to PBA than pyrethroids. After its exclusion, the maximum value for PBA was 20.0 µg/l.

^f The 95th percentile for the 24-h collection was 4.23 µg/l after exclusion of one subject with very high PBA levels.

Table 7

Detection rate, total amounts and concentrations of pyrethoid and pyrethrin metabolites in the urine of children (nighttime collections)

Metabolites	n detected (%)	Amount (pmol/kg bw)							Concentration (µg/l)						
		min ^a	max	Percentiles					min ^a	max	Percentiles				
				5	25	50	75	95			5	25	50	75	95
tDCCA ^b	83(97.6)	<LOD	7999	4	9	13	25	207	0.01	180	0.07	0.16	0.24	0.56	4.10
cDCCA ^b	82(96.5)	<LOD	844	1	3	5	8	59	0.007	19.0	0.02	0.06	0.10	0.18	0.76
PBA ^b	80(94.1)	<LOD	2299	0.3	5	10	21	73	0.01	53.0	0.01	0.10	0.20	0.46	1.54
CDCA ^b	64(75.3)	<LOD	79	<LOD	1	2	5	14	0.009	1.5	<LOD	0.01	0.05	0.11	0.39
DBCA ^b	11(12.9)	<LOD	25	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	5	0.006	0.65	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.03
FPBA ^b	14(16.4)	<LOD	6	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	1	0.005	0.23	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.14

^a In all the cases, the minimum is equal to the limit of detection (LOD).^b Urine collected between 6 pm and the morning (including first void) adjusted to 12h.

3.3. Total pyrethroid exposure

To obtain an indication of the overall exposure to pyrethroids, a composite measurement corresponding to the molar sum of cyclopropane carboxylic acid metabolites was used. In adults, it was observed that total excretion of the latter metabolites in 24-h collections ranged from below the LOD to 1855 pmol/kg bw/day and the 5th, 25th, 50th, 75th and 95th percentiles were respectively 11, 21, 40, 86 and 567 pmol/kg bw/day. In children, values extrapolated to 24-h from the 12-h nighttime collections ranged from below the LOD to 17 690 pmol/kg/day and the 5th, 25th, 50th, 75th and 95th percentiles were respectively 15, 32, 48, 73 and 635 pmol/kg bw/day. It is noteworthy that the highest composite measurement was found in a child treated for head lice. Nighttime excretion of the sum of cyclopropane carboxylic acids in children was not significantly different from nighttime values in adults ($p = 0.088$). Similarly, total excretion of the sum of cyclopropane carboxylic acids in children extrapolated to 24-h was not significantly different from the 24-h composite measurement in adults ($p = 0.099$).

3.4. Correlations between metabolites

Both in adults and children, the three pyrethroid metabolites present in highest amounts (tDCCA, cDCCA, PBA) were well correlated. In particular, in the adult sample, the strongest correlation was observed between tDCCA and cDCCA excretion in nighttime urine collections ($r_s \geq 0.891$ and $p < 0.001$). As with the adult sample, in children, the strongest correlation was also found between tDCCA and cDCCA ($r_s \geq 0.877$ and $p < 0.001$). The latter metabolites were however not correlated with CDCA excretion ($p > 0.177$).

3.5. *Variation in the excretion of metabolites between daytime and nighttime collections in adults*

Nighttime excretion of cDCCA (median = 4.9 pmol/kg bw) was significantly higher ($p = 0.003$) than daytime excretion (median = 4.1 pmol/kg bw). For tDCCA and PBA, the differences were not statistically significant but the nighttime 75th, 90th and 95th percentiles were systematically higher than corresponding daytime values.

3.6. *Associations with exogenous factors*

In both adults and children, the associations between the number of portions of different dietary products (fruits and vegetables, dairy products, meat and substitutes, cereals) consumed on average each day, as assessed by questionnaire, and the excretion of tDCCA, cDCCA, PBA and CDCA were tested. For all food products, there were no consistent associations between the number of portions consumed on average daily and the excreted amounts per kg bw of these pyrethroid metabolites.

No consistent associations were observed between the excretion of the different pyrethroid metabolites and most of the other factors evaluated by questionnaire (see Table 1), except for the following. In adults, the only observed associations were with drugs consumption and smoking (men plus women all together). The use of prescription drugs and non-prescription drugs in adults (34 cases) appeared to be statistically associated with higher excreted amounts per kg bw of tDCCA ($p \leq 0.011$), cDCCA ($p \leq 0.085$) and PBA ($p \leq 0.006$). However, a larger proportion of women (27/48) used medication than men (9/25) and when the relations between excreted amounts of metabolites and medication were tested separately for men [tDCCA ($p = 0.065$), cDCCA ($p = 0.136$), PBA ($p = 0.007$)] and women [tDCCA ($p = 0.047$), cDCCA ($p = 0.106$), PBA ($p = 0.149$)], they were less

consistent. On the other hand, smokers (men plus women) apparently had lower urinary weight-adjusted amounts of tDCCA ($p \leq 0.017$), cDCCA ($p < 0.003$) and PBA ($p \leq 0.171$) than non-smokers, although not statistically significant for PBA. In this case, men (8/25) smoked in higher proportion than women (9/48) and separate analysis for men and women showed systematically significant results for men for all three metabolites but not for women (in men, p values = 0.013, 0.031, 0.028 and in women p values = 0.114, 0.003, 0.250 for tDCCA, cDCCA and PBA, respectively). It is also noteworthy that women had higher total amounts of PBA per kg bw ($p < 0.044$) than men and a similar tendency was observed for the other metabolites although not significant ($p \leq 0.196$ for tDCCA and $p \leq 0.180$ for cDCCA).

In children, age did not have any impact on the total amounts of tDCCA, cDCCA and PBA excreted per kg bw ($p > 0.099$). However, the recent use of head lice treatment in children (2 cases) resulted in a higher excretion of the main pyrethroid metabolites, tDCCA, cDCCA and PBA ($p \leq 0.010$). There was also a significantly lower excretion of CDCA in children consuming certified organic food (median = 1.27 pmol/kg bw; $n = 33$) compared to those eating non-organic food (median = 2.92 pmol/kg bw; $n = 48$) ($p = 0.028$).

4. Discussion

We adapted from the published study of Leng et al. (2006) a sensitive method for the simultaneous determination of low levels of several urinary biomarkers of exposure to pyrethroids and pyrethrins. These are tDCCA, cDCCA, DBCA, PBA, FPBA, in addition to CDCA, the latter of which has been rarely measured in environmental studies. This method

allowed us to detect trace amounts of pyrethroid metabolites with LOD ranging from 0.005 to 0.01 $\mu\text{g/l}$, which are below the values of 0.01 to 0.05 $\mu\text{g/l}$ reported by Leng et al. (2006). It allowed obtaining an indication of the extent of exposure to pyrethroids in the largest metropolitan area of the Province of Quebec, Canada.

Cumulative urinary excretion of pyrethroid metabolites was used to assess exposure since it is directly proportional to the absorbed dose of the parent compound. In humans, current literature data suggest relatively short urinary excretion half-lives (from 6 to 13 h) for pyrethroid metabolites (Leng et al., 1997). On that basis, relying on cumulative urinary amounts of metabolites expressed in pmol/kg bw ensures a fair indication of the absorbed daily dose. Compared to the determination of concentrations ($\mu\text{g/l}$) or creatinine-adjusted concentrations ($\mu\text{g/g}$), this approach allows us to avoid confounding factors such as variations in urine dilution due to variations in liquid intake or variations in creatinine levels associated with factors such as ethnic origin or age (Barr et al., 2005) or protein intake (Kesteloot and Joossens, 1993; Neubert and Remer, 1998). Furthermore, an accurate comparison between individuals was made possible with the standardization of the excreted amounts of each metabolite for the body weight and the duration of the urine collection for each individual.

Both in adults and children, it was shown that tDCCA, cDCCA and PBA were the metabolites excreted in greatest amounts (pmol per 12 or 24-h urine collections/ kg bw); these metabolites were also well correlated, as expected, given that many stem from the same parent compounds (Sudakin, 2006), namely, permethrin and cypermethrin. The excretion of these metabolites was however not correlated to amounts of CDCA excreted; this is likely due to a differential use of CDCA parent compounds.

4.1. Comparison with other countries

We compared our results with other published data which relied on the measurement of metabolite concentrations per liter of urine as an indication of exposure; these results are presented in Table 8. In adults, the median urinary concentrations of the most common metabolites, tDCCA, cDCCA and PBA (in the last case after exclusion of one individual), were in the same range as the median values observed by the CDC (2005) in the adult US population while the 95th percentiles of our study were 1 to 1.4 times those obtained by the CDC (2005); this indicates a similar exposure to DCCA and PBA generating pyrethroids in both populations. In a German population studied by Heudorf et al. (2001), the median concentrations of tDCCA and cDCCA (PBA not reported) were similar to the ones observed in our study whereas the 95th percentile concentrations in our study were 1.8 to 2 times those found in Heudorf et al.'s study. This suggests an overlap of both distributions of exposure although some individuals were more exposed in the Montreal sample than in German one. However, the studies were conducted at two different periods (1998 in Germany and 2005 in Canada), and the use of pyrethroids may have increased during that time. On the other hand, for the specific metabolites DBCA and FPBA, the median and 95th percentile values were lower in our sample of the Montreal Island population than in the German population sample studied by Heudorf et al. (2001), maybe due to geographical differences in the use of deltamethrin and fluoro-substituted pyrethroids. DBCA and FPBA were also measured by the CDC (2005) but their limit of detection (0.1 and 0.2 µg/l) did not allow for the quantification of these metabolites. In the present study, the LOD for those metabolites were respectively 0.006 and 0.005 µg/l.

In children of this study, the 95th percentile concentrations of the most common metabolites, tDCCA, cDCCA and PBA, were respectively 1.6, 1.0 and 0.5 times the 95th

percentile values observed in the 6 to 12 years old US population by the CDC (2005). The 95th percentile concentrations of *tDCCA*, *cDCCA* were 3.2 and 1.4 to times, respectively, the values observed in the 6 to 11 years old population studied by Heudorf et al. (2001) (*PBA* concentrations were not reported). These comparisons show again an overlap between the distributions of concentrations in the different studies. It is noteworthy that concentrations presented in the other studies were based on spot samples whereas we used 12-h or 24-h collections.

Table 8

Comparison of the median and 95th percentile concentrations of the different pyrethroid metabolites measured in this study in adults and children with those obtained in other published studies

Metabolite (sample)	Median ($\mu\text{g/l}$)			95th Percentile ($\mu\text{g/l}$)		
	Montreal (Canada) ^a	CDC (US) ^b	Germany ^c	Montreal (Canada) ^a	CDC (US) ^b	Germany ^c
<i>tDCCA</i>						
Adults	0.25	<0.4	0.23	3.48	2.56	1.67
Children	0.24	<0.4	0.26	4.10	2.50	1.27
<i>cDCCA</i>						
Adults	0.10	<0.1	<0.2	1.15	0.960	0.65
Children	0.10	<0.1	<0.2	0.76	0.730	0.53
<i>PBA</i>						
Adults	0.17	0.17	n.a. ^e	4.23	3.10	n.a. ^e
Children	0.20	0.30	n.a. ^e	1.54	3.28	n.a. ^e
<i>CDCA</i>						
Adults	<0.009	n.a. ^e	<0.05 ^d	0.15	n.a. ^e	0.15 ^d
Children	0.05	n.a. ^e	n.a. ^e	0.39	n.a. ^e	n.a. ^e
<i>DBCA</i>						
Adults	<0.006	<0.1	<0.1	0.14	<0.1	0.29
Children	<0.006	<0.1	<0.1	0.09	<0.1	0.32
<i>FPBA</i>						
Adults	<0.005	<0.2	<0.1	0.03	<0.2	0.10
Children	<0.005	<0.2	<0.1	0.02	<0.2	0.27

^a Corresponds to the concentration of pyrethroid and pyrethrin metabolites in 24-h urine collections.

^b CDC (2005).

^c Heudorf et al. (2001) except where noted.

^d Leng et al. (2006).

^e n.a. = not available.

4.2. Comparison between adults and children

Adults appeared to excrete tDCCA, cDCCA and PBA metabolites in amounts similar to children, after adjustment for the body weight. However, interestingly, CDCA appeared to be excreted in larger amounts per kg of body weight in children than in adults (on the basis of the median and 95th percentile values). The higher excretion of CDCA in children suggests differences in the exposure to some pyrethroids and to pyrethrins between adults and children. Indeed, CDCA is the metabolite of pyrethroid compounds (allethrin, tetramethrin, resmethrin, phenothrin, prallethrin), which are mainly used in Quebec for the extermination of insect pests inside and outside residential and commercial settings rather than in agriculture (on crops). However, in the current study, the use of pesticides at home during the three weeks preceding sampling was seldom reported by questionnaire. In the study of Heudorf et al. (2001) in a large urban population of Germany, no significant differences in the excretion of pyrethroid metabolites (expressed as μg metabolites/l of urine) between children and adults were reported; however, they did not measure CDCA.

4.3. Factors potentially influencing metabolite excretion

The associations between pyrethroid and pyrethrin metabolites and different factors documented by questionnaire were tested as well. In adults, the only external factors which appeared to have an effect on metabolite levels, tDCCA, cDCCA and in some cases PBA, were the use of prescription or non-prescription drugs and cigarette smoking. The higher excretion of these metabolites observed in adults consuming medicines was however not preserved when studied separately for men and women. The statistically lower excreted amounts of tDCCA and cDCCA metabolites, which was observed in smokers compared to non smokers of the entire adult population, persisted in men but was less clear in women.

This could be due to a diet poorer in fruits, vegetables and cereals as well as dairy products in smokers.

In children, only the use of head lice treatment was found to significantly influence the excretion of pyrethroid metabolites. Such treatments could be an important source of acute exposure. In particular, in a controlled study in human volunteers, Tomalik-Scharte et al. (2005) showed that the application on hair of a solution containing permethrin contributed to significantly increase the excretion rate of DCCA; peak excretion was observed 12 h after the beginning of application and excretion was complete within a week post-exposure.

Another interesting aspect of this study is the fact that exposure was assessed not only on the basis of individual pyrethroid metabolite measurements but also using a composite measurement, which corresponds to the sum of the different cyclopropane carboxylic acid metabolites. Although this exposure measurement does not account for all the pyrethroids and pyrethrins to which the Montreal general population is potentially exposed, it appears as a useful index to estimate the overall exposure to pyrethroids and pyrethrins and to facilitate the assessment of safety judgment. Among the metabolites not considered in the composite measurement, there is PBA, a phenoxy benzyl derivative, since it originates from pyrethroids which also form cyclopropane carboxylic acid metabolites (Kaneko and Miyamoto, 2001). However, some pyrethroids, cyhalothrin- λ , esfenvalerate, fenpropathrin, flucythrinate and fluvalinate, can only, for the time being, be detected through measurements of phenoxybenzyl derivatives such as PBA, 4-hydroxy-3-phenoxybenzoic acid and 3-phenoxybenzyl alcohol (Table 1); these compounds are therefore not accounted for in the composite exposure index.

4.4. Conclusions

Our studied population appeared to be exposed to similar amounts of pyrethroids and pyrethrins than the US population surveyed by the CDC (2005). This could stem from similar exposure to pesticide residues found on food or similar eating habits. Children of this study however appeared to be more exposed to the types of pyrethroids used in extermination than adults perhaps due to their playing habits and shorter height. It was also shown that pediculocide treatment can acutely contribute to a higher exposure to pyrethroids and this source of exposure appears to be more common in kids than adults. This study was done during a period of the year where a lot of locally grown vegetables and fruits are available and are likely to be consumed by the population. To obtain a full picture of Montrealers exposure to pyrethroids, other studies should be done at other periods of the year when the consumption of imported fruits and vegetables is more important.

Acknowledgments

The authors are indebted to Drs. A. Charette and W. Lin for the synthesis of CDCA. The authors also thank all the participants. This work was supported by the *Institut national de santé publique du Québec* and Marie-Chantale Fortin is a recipient of a scholarship from the *Fonds de la recherche en santé du Québec*.

References

- Barr, D.B., Wilder, L.C., Caudill, S.P., Gonzalez, A.J., Needham, L.L., Pirkle1, J.L., 2005. Urinary creatinine concentrations in the U.S. population: implications for urinary biologic monitoring measurements. *Environ. Health Perspect.* 113, 192-200.
- Bouvier, G., Seta, N., Vigouroux-Villard, A., Blanchard, O., Momas, I., 2005. Insecticide urinary metabolites in nonoccupationally exposed populations. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 8, 485-512.
- Bradberry, S.M., Cage, S.A., Proudfoot, A.T., Vale, J.A., 2005. Poisoning due to pyrethroids. *Toxicol. Rev.* 24, 93-106.
- CDC, 2005. Third National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta, Georgia.
- CFIA, 2007a. Report on Pesticides, Agricultural Chemicals, Veterinary Drugs, Environmental Pollutants and Other Impurities in Agri-Food Commodities of Animal Origin, 2004-2005. Canadian Food Inspection Agency, Government of Canada, Canada,.
- CFIA, 2007b. Report on Pesticides, Agricultural Chemicals, Environmental Pollutants and Other Impurities in Agri-Food Commodities of Plant Origin, 2004-2005. Canadian Food Inspection Agency, Government of Canada, Canada.

- Choi, J.S., Soderlund, D.M., 2006. Structure-activity relationships for the action of 11 pyrethroid insecticides on rat Na_v1.8 sodium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 211, 233-244.
- Eadsforth, C.V., Baldwin, M.K., 1983. Human dose-excretion studies with the pyrethroid insecticide cypermethrin. *Xenobiotica* 13, 67-72.
- Heudorf, U., Angerer, J., 2001. Metabolites of pyrethroid insecticides in urine specimens: current exposure in an urban population of Germany. *Environ. Health Perspect.* 109, 213-217.
- Hille, B., 2001. *Ion Channels of Excitable Membranes*, 3rd ed. Sinauer, Sunderland, MA.
- JECFA, 2004. *Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants: Sixty-Second Report*. WHO Technical Report 925. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Rome, Italy.
- Kaneko, H., Miyamoto, J., 2001. J. Pyrethroid chemistry and metabolism. In: Krieger, R., Doull, J. and Ecobichon, D. (Eds.), *Handbook of Pesticide Toxicology*, vol. 2. Academic Press, San Diego, pp. 1263-1288.
- Kesteloot, H.E., Joossens, J.V., 1993. Relationship between dietary protein intake and serum urea, uric acid and creatinine, and 24-hour urinary creatinine excretion: the BIRNH Study. *Am. Coll. Nutr.* 12, 42-46.

- Kim, S.S., Lee, R.D., Lim, K.J., Kwack, S.J., Rhee, G.S., Seok, J.H., Lee, G.S., An, B.S., Jeung, E.B., Park, K.L., 2005. Potential estrogenic and antiandrogenic effects of permethrin in rats. *J. Reprod. Dev.* 51, 201-210.
- Leng, G., Gries, W., 2005. Simultaneous determination of pyrethroid and pyrethrin metabolites in human urine by gas chromatography-high resolution mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 814, 285-94.
- Leng, G., Gries, W., Selim, S., 2006. Biomarker of pyrethrum exposure. *Toxicol. Lett.* 162, 195-201.
- Muller-Mohnssen, H., 1999. Chronic sequelae and irreversible injuries following acute pyrethroid intoxication. *Toxicol. Lett.* 107, 161-176.
- Neubert, A., Remer, T., 1998. The impact of dietary protein intake on urinary creatinine excretion in a healthy pediatric population. *J. Pediatr.* 133, 655-659.
- Omalley, M., 1997. Clinical evaluation of pesticide exposure and poisonings. *Lancet* 349, 1161-1166.
- Ray, D.E., Sutharsan, S., Forshaw, P.J., 1997. Action of pyrethroid insecticides on voltage-gated chloride channels in neuroblastoma cells. *Neurotoxicology* 18, 755-760.

- Saieva, C., Aprea, C., Tumino, R., Masala, G., Salvini, S., Frasca, G., Giurdanella, M.C., Zanna, I., Decarli, A., Sciarra, G., Palli, D., 2004. Twenty-four-hour urinary excretion of ten pesticide metabolites in healthy adults in two different areas of Italy (Florence and Ragusa). *Sci. Total Environ.* 332, 71-80.
- Schettgen, T., Heudorf, U., Drexler, H., Angerer, J., 2002. Pyrethroid exposure of the general population – is this due to diet? *Toxicol. Lett.* 134, 141-145.
- Shafer, T.J., Meyer, D.A., 2004. Effects of pyrethroids on voltage-sensitive calcium channels: A critical evaluation of strengths, weaknesses, data needs, and relationship to assessment of cumulative neurotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 196, 303-318.
- Statistics Canada, March 2007. Population Counts for Canada, Provinces and Territories, Census Divisions and Census Subdivisions (Municipalities), by Urban and Rural, 2006 Census - 100% Data. Government of Canada, Canada: <http://www12.statcan.ca/english/census06/data/popdwell/Notes.cfm?T=306&SR=51&S=0&O=A&RPP=25&PR=24&CMA=0>.
- Soderlund, D.M., Clark, J.M., Sheets, L.P., Mullin, L.S., Piccirillo, V.J., Sargent, D., Stevens, J.T., Weiner, M.L., 2002. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology* 171 (1), 3-59.
- Sudakin, D.L., 2006. Pyrethroid Insecticides: Advances and Challenges in Biomonitoring. *Clin. Toxicol.* 44 (1), 31-37.

Tomalik-Scharte, D., Lazar, A., Meins, J., Bastian, B., and Ihrig, M., Wachall, B., Jetter, A., Tantcheva-Poor, I., Mahrle, G., Fuhr, U., 2005. Dermal absorption of permethrin following topical administration. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 61 (5-6), 399-404.

Undeger, U., Basaran, N., 2005. Effects of pesticides on human peripheral lymphocytes in vitro: Induction of DNA damage. *Arch. Toxicol.* 79, 169-176.

Valcke, M., and Belleville, D., 2002. Évaluation des Risques Toxicologiques Associés à l'Utilisation d'Adulticides dans le Cadre d'un Programme de Lutte Vectorielle Contre la Transmission du Virus du Nil Occidental. Institut national de santé publique du Québec, Québec, Canada.

Wilks, M.F., 2000. Pyrethroid-induced paresthesia - a central or local toxic effect? *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 38, 103-105.

Woollen, B.H., Marsh, J.R., Laird, W.J.D., Lesser, J.E., 1992. The metabolism of cypermethrin in man: differences in urinary metabolite profiles following oral and dermal administration. *Xenobiotica* 22, 983-91.

Contribution des auteurs

Marie-Chantale Fortin: a rédigé la demande de subvention, contribué à la conception du projet, rédigé la demande au comité d'éthique, rédigé la documentation pour les

participants, supervisé et organisé la collecte de données sur le terrain, effectué l'analyse statistique, interprété les résultats, rédigé le manuscrit original et effectué ses révisions.

Michèle Bouchard : a révisé la demande de subvention, contribué à la conception du projet, révisé la demande au comité d'éthique, révisé la documentation pour les participants, supervisé l'analyse statistique, a contribué à l'interprétation des résultats et a révisé le manuscrit original et ses révisions.

Gaétan Carrier : a contribué à la conception du projet, à l'interprétation des résultats et à la révision du manuscrit original.

Pierre Dumas : a mis au point la méthode analytique, effectué les analyses biochimiques et rédigé la partie analytique dans la section matériel et méthode du manuscrit original.

**Assessment of exposure to pyrethroids and pyrethrins in a rural population of the
Montérégie area, Quebec, Canada²**

Caroline Couture¹, Marie-Chantale Fortin¹, Gaétan Carrier¹, Pierre Dumas², Claude Tremblay³ and Michèle Bouchard^{1*}

¹ Département de santé environnementale et santé au travail, Faculté de Médecine, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

² Institut national de santé publique du Québec, 945 Wolfe, Sainte-Foy, Québec, Canada G1V 5B3

³ Agence de la santé et des services sociaux de la Montérégie, 1255 Beauregard, Longueuil, Québec, Canada, J4K 2M3

*Corresponding author:

Michèle Bouchard
Department of Environmental and Occupational Health
Université de Montréal
P.O. Box 6128, Main Station, Montreal, Quebec
H3C 3J7, CANADA
Telephone: (514) 343-6111 ext 1640
Fax: (514) 343-2200
Email: michele.bouchard@umontreal.ca

² Article accepté pour publication dans Journal of Occupational and Environmental Hygiene, le site web du journal est <http://www.informaworld.com>.

ABSTRACT

Pesticide use remains a preoccupation for the population and public health authorities given its possible impact on health. Pyrethroids can be listed among the widely used pesticides. The general population is potentially chronically exposed to pyrethroids mainly through food intake but acute or sporadic exposures can also occur by other routes. Although pyrethroids are considered among the least toxic pesticides, their neurotoxic properties can affect humans, but current exposure levels in the population of Quebec are not known. The study thus aimed at assessing pyrethroid exposure in a rural agricultural population during summertime, through measurements of urinary biomarkers. A total of 163 volunteers, 49 children and 114 adults, living in the Montérégie area of Quebec, participated in the study, which took place from June to August 2006, the period of intensive application of pesticides. Participants were asked to collect all their micturitions from 6 p.m. until the next morning, including first morning void, and had to fill a questionnaire to document factors that could potentially contribute to exposure. A gas-chromatography mass-spectrometry method was used to quantify six urinary metabolites resulting from pyrethroid biotransformation: *cis*- and *trans*-2,2-(dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylic acid (cDCCA and tDCCA), 3-phenoxybenzoic acid (PBA), chrysanthemum dicarboxylic acid (CDCA), *cis*-2,2-(dibromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylic acid (DBCA) and 4-fluoro-3-phenoxybenzoic acid (FPBA). Distributions of amounts of the six metabolites excreted per unit of body weight, during a standardized 12-h period, followed the same decreasing pattern in adults and in children: tDCCA > PBA > cDCCA > CDCA > DBCA > FPBA. No statistically significant difference was observed between the two groups, but amounts of metabolites varied greatly among individuals, suggesting important inter-individuals variations in the absorbed doses

of these compounds. No consistent associations were observed between the excretion of correlated metabolites and the various factors documented by questionnaire (personal factors, life habits, sources of exposure). Comparison of the current data with those observed in other rural population suggests a similar exposure.

Keywords: Pesticides, pyrethroids, biological monitoring, human exposure, biomarkers.

This study was funded by the *Institut national de santé publique du Québec*. The protocol of this study, requiring the enrolment of humans, as well as the questionnaires and the consent forms, were approved by the Human Research Ethics Committee of the Faculty of Medicine of the Université de Montréal prior to the onset of the study.

INTRODUCTION

Exposure to pesticides and their possible health impact is a recurrent preoccupation for the general population. Pyrethroids are among the pesticides increasingly used; their molecular structure is derived from that of natural pyrethrins and they are chemically engineered to improve their persistence in the environment⁽¹⁾. They are abundantly used in agriculture, in horticulture, in residential settings (as an insect repellent, for the treatment of head lice and fleas) and by exterminators. In general, humans are exposed to pesticides mainly through the ingestion of contaminated food and, in some cases, through skin contact with treated surfaces⁽²⁾. These exposure routes could thus potentially be responsible for pyrethroid exposure specifically^(3,4). Bradman et al.⁽⁵⁾ also identified indoor dusts, surface wipes and clothing as potential sources of exposures in infants and toddlers living on a farm

where those insecticides are used, given their particular behaviors (hand-to-mouth frequency, crawling, etc). With regard to inhalation, it usually represents a non significant route of exposure to pyrethroids in non-professional settings given their low volatility and low concentrations (ng/m^3) in indoor air^(5,6).

Pyrethroids and pyrethrins affect nerve impulse transmission in insects mainly through their action on voltage-sensitive sodium channels⁽⁷⁾ and they can elicit similar effects on the human nervous system at high doses. The extent of pyrethroid exposure – and other pesticide exposure – in agricultural workers and their families has recently been assessed in the US⁽⁸⁾, but no published data are currently available regarding the importance of exposure to pyrethroids and pyrethrins in rural populations of Quebec.

One of the approaches considered reliable to assess exposure to pesticides consists of measuring biotransformation products of these compounds excreted in urine. In the particular case of pyrethroids and pyrethrins, several biomarkers resulting from the biotransformation of one or more of these compounds have been identified (see Table I)^(4,6,8). In order to obtain an indication of the absorbed dose of a chemical, total amounts of metabolites excreted in urine over given time-periods can be used⁽⁹⁻¹¹⁾. The aim of this study was to obtain an estimation of the absorbed dose of pyrethroids and pyrethrins in children and adults of the general population of an agricultural area of the Province of Quebec, Canada, the Montérégie, using urinary biomarker measurements.

TABLE I. Parent Compounds Associated With Each Measured Metabolite

Metabolite(s)	Parent compound(s)
<i>trans</i> -DCCA (<i>trans</i> -Cl ₂ CA) and <i>cis</i> -DCCA (<i>cis</i> -Cl ₂ CA)	Cyfluthrin, cypermethrin, permethrin
3PBA (or m-PBA)	Permethrin, cypermethrin, deltamethrin, esfenvalerate, cyhalothrin-λ, fenpropathrin, flucythrinate, fluvalinate, phenothrin
DBCA (<i>cis</i> -Br ₂ CA)	Deltamethrin
<i>trans</i> -CDCA	Bioresmethrin, resmethrin, bioallethrin, D- <i>trans</i> -allethrin, D- <i>cis-trans</i> -allethrin, phenothrin, prallethrin, tetramethrin, natural pyrethrums (mix of cinerin 1 & 2, jasmolin 1 & 2 and pyrethrin 1& 2)
4F-3PBA	Cyfluthrin, flumethrin

METHODS

Area and population selection

In Quebec, the Montérégie represents the ideal area to study exposure of a rural population during the agricultural production period, which is summer. Indeed, it is a vast agricultural region dedicated in large part to the production of vegetables, small fruits, fruit trees, and cereals^(12,13), and pyrethroids and pyrethrins are likely to be used in those crops. In this study, seven municipalities of the Regional County Municipality (RCM) of Rouville (St-Mathias-sur-Richelieu, Rougemont, St-Paul-d'Abbotsford, St-Césaire, Marieville, Ange-Gardien, Ste-Angèle-de-Monnoir) and three other adjoining municipalities (St-Damase, St-Pie, Cantons de Granby) have been selected. All these municipalities are considered “rural” because they have a population density of less than 150 inhabitants per

km²⁽¹⁴⁻¹⁵⁾. Moreover, despite this small population density, the number of households in the targeted area was sufficiently large to obtain a sufficient number of participants for the study, particularly in the case of children. In addition, in the selected municipalities, contrary to several other municipalities of the Province of Quebec where a municipal regulation considerably limits outdoor use of pesticides, the only regulation in effect was the provincial legislation on pesticide use, which requires that agricultural producers obtain an authorization certificate to purchase or use pesticides.

Among the ten selected municipalities, children aged 6 to 12 years old and adults aged 18 to 70 years old were recruited. These age groups were chosen to facilitate comparison with published literature data, mainly available for those age groups, and to avoid nocturnal enuresis, which is rare for children of that age. All recruited individuals participated on a voluntary basis.

Recruitment of volunteers and sample characteristics

The study participants were randomly recruited from a list of names and mailing addresses provided by the polling company *Echantillonneur ASDE Inc.* Potential participants in this list were initially approached by mail and then by phone according to the randomly generated order. Individuals interested in participating were invited to answer by phone a questionnaire to verify their eligibility. Persons with renal or hepatic diseases or those treated for a cancer were excluded. Furthermore, to participate in the study, volunteers had to remain at home most of the time during the days preceding sampling to ensure that their exposure conditions were representative of their usual home environment. However, individuals exposed to pesticides at work were not excluded. In total, the target

number of participants was established at 120 adults and 120 children with the hypothesis of a maximum withdrawal of 20% as was done in a prior study⁽¹⁰⁾.

Data collection

Researchers met with the participants at their home to explain the study, the procedure for urine collection and the questionnaire, provide the necessary material (a self-administered questionnaire and a bottle for urine collection) and answer any remaining questions. They later returned to pick up the urine sample and questionnaire. After filling the consent form, participants were invited to provide a complete 12-h urine collection, once between June 5th and August 7th inclusively, i.e. during the period of intense pesticide spreading, in order to assess their exposure. They were asked to collect all their urines from 6 p.m. until the next morning, including first morning void. The time of first and last void had to be recorded on the urine bottle provided and on the self-administered questionnaire, along with the time of the last micturition prior to the onset of collection. Parents or tutors were asked to help their child if needed. If a problem occurred during the collection period (e.g., missing of a micturition or urine lost), participants were asked to rinse the bottle with water and start over on another day. Samples were collected in high density polypropylene Nalgene[®] bottles of 1.0 L for children and 1.5 L for adults; they were then kept in a refrigerator by the participants. Samples were generally picked up by our research team within 72 h following collection. Once at the laboratory, urine volumes were measured and samples were frozen at -20⁰C until analysis.

Participants were also invited to fill a self-administered questionnaire, the day of their urine collection, to document potential sources of exposure to pesticides, including dietary intake, and obtain information on life-habits and activities during the three days or the week preceding the onset of urine collection; the questionnaire further aimed at documenting personal and sociodemographic characteristics such as age, weight, height and family income. Prior to the study, this questionnaire was tested and reviewed taking into account the comments formulated by the people who participated in the pre-testing.

Sample treatment

Sample treatment and analysis was conducted at the laboratory of the National Institute of Public Health of Quebec (Institut national de santé publique du Québec (INSPQ)), which is accredited ISO 17025 by the Standards Council of Canada. The sample treatment was conducted according to the procedure used in Fortin et al. ⁽¹⁰⁾, which is an adaptation of the method of Leng et al. ⁽¹⁶⁾. First, 5 mL of urine were transferred into a tube and isotope labelled internal standards were added (50 µL of ¹³C₆-3-phenoxybenzoic acid and ¹³C₄-tDCCA, 1 mg/L). The pesticide metabolites in urine were deconjugated with 10 µL of β-glucuronidase in 5 mL of acetate buffer (pH = 5) for 16 h at 37°C. After acidification with 1 mL of concentrated hydrochloric acid, extraction was performed with 5 mL of dichloromethane and samples were shaken for 5 min and then centrifuged for 5 min at 2000 g. The organic layer was separated and the extraction was carried out once more on the remaining. The organic phases were pooled and evaporated to dryness. The residue was dissolved in 250 µL of acetonitrile and derivatized with 30 µL of 1,1,1,3,3,3-

hexafluoroisopropanol and 20 μL of N,N-diisopropylcarbodiimide for 10 min at room temperature. For the extraction, 1 mL of NaHCO_3 1 M and 250 μL of hexane were added. Tubes were shaken for 10 min and then centrifuged for 5 min at 2000 g. The hexane layer was recovered and concentrated in a microvial to a final volume of 150 μL .

Chromatographic analysis of samples

Urinary concentrations of six metabolites, cis- and trans-2,2-(dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylic acid (cDCCA and tDCCA), 3-phenoxybenzoic acid (PBA) chrysanthemum dicarboxylic acid (CDCA), cis-2,2-(dibromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylic acid (DBCA) and 4-fluoro-3-phenoxybenzoic acid (FPBA), were determined by gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS).

More specifically, sample analysis was performed with an Agilent 6890N gas chromatograph (GC) equipped with a split/splitless injector, an Agilent 7683 autosampler, an Agilent XLB column (60 m length; 0.25 mm internal diameter; 0.25 μm film thickness) and coupled to an Agilent 5973N mass selective detector (MSD). The carrier gas flow was adjusted to 0.8 mL/min of helium (constant flow). The oven temperature program was ramped from 70°C (2 min hold time) to 200°C (4.6°C/min) (2 min hold time) than to 290°C (40°C/min) (5 min hold time). The injector and transfer line were kept at 275°C and 280°C, respectively. The volume of extract injected in pulsed splitless mode was 2 μL . The MSD was operated in selected ion monitoring (SIM) mode, using electron capture negative

ionization with methane (99.97% purity) as the reagent gas; the ionization source temperature was set to 150°C and the quadrupole temperature to 103°C.

Method validation and quality control management

Method performance has been validated according to ISO 17025 requirements. Data in terms of sensitivity, reproducibility and recovery are presented in Table II.

As for Quality control management, each analytical sequence of 20 samples incorporates one blank urine, one blank urine spiked with 1 µg/l of each metabolite, one certified external control (Recipe Clincheck Control Germany) and one internal control. Results obtained on controls had to be within $\pm 15\%$ of the certified or target values to release sample results. The spiked urine was used to validate and adjust the calibration if needed. No blank urine showed detectable levels of pyrethroid metabolites; therefore, no blank subtraction was necessary to apply.

TABLE II. Performance of the Analytical Method

Analytes	Detection limit ^A ($\mu\text{g/l}$)	Limit of quantification ^B ($\mu\text{g/l}$)	Working range ($\mu\text{g/l}$)	Repeatability ^C (coefficient of variation (%)) (n = 10)	Reproducibility ^D (coefficient of variation (%)) (n = 10)	Recovery ^E (mean % \pm SD) (n = 3)
tDCCA	0.0096	0.032	0.05 - 6	2.7	7.2	96 \pm 1
cDCCA	0.0072	0.024	0.05 - 4	3.6	6.4	91 \pm 3
3-PBA	0.013	0.043	0.05 - 10	3.5	5.0	93 \pm 4
CDCA	0.0088	0.029	0.05 - 10	5.5	8.7	37 \pm 5
DBCA	0.0060	0.020	0.05 - 10	4.1	8.1	92 \pm 4
FPBA	0.0053	0.018	0.05 - 10	3.6	5.0	89 \pm 1

^A Defined as 3 times the standard deviation from ten replicates of blanks spiked with pyrethroid metabolites levels ranging between 4 and 10 times the instrumental limit of detection, which was estimated to 3 times the signal to noise ratio.

^B Defined as 3.3 times the detection limit.

^C Precision for a given batch of analysis (same day, same calibration).

^D Essentially equivalent to the reproducibility except over a longer period of time (different days and different calibrations).

^E Percent recovery of pyrethroid metabolites using blank urine with low, medium and high specific gravity spiked with 0.5 $\mu\text{g/l}$ of standard.

The method accuracy has also been tested by participating in the German External Quality Scheme for tDCCA, cDCCA, 3-PBA and DBCA, and results always showed a good agreement with reference values.

Statistical analysis

Descriptive statistics were computed with the Microsoft[®] Office Excel 2003 software and analytical statistics were performed with SPSS[®] for Windows, version 15.0. Instead of relying on volume-weighted or creatinine-adjusted concentrations, total amounts of metabolites excreted over a given period of time were used⁽¹⁰⁾ to obtain an indication of the actual daily absorbed dose of the exposed population. To render data comparable for

statistical analysis, it was deemed essential to standardize the data for the two following factors. Amounts of metabolites excreted over the nighttime collection period were expressed per kg per body weight (pmol/kg bw) to correct for the large variations in the body weight from one individual to another. In addition, given that the total urine collection period varied from one participant to another, the duration of the collections was also adjusted on exact 12-h periods by calculating the hourly excretion rate and by multiplying its value by 12.

Samples with metabolite concentrations below the LOD were attributed the value of half the limit of detection for analysis purposes. In addition, the urine samples from participants with incomplete collections – 4 adults and 4 children who reported a loss of 10% or more of the total volume excreted during the whole collection period – were not included in the analysis.

Comparative statistical analysis was then performed for metabolites with a percentage of non-detection of $\leq 30\%$ in general, i.e. for tDCCA, cDCCA, PBA and CDCA. They were also performed for total cyclopropane carboxylic acids (TCA), an elaborated composite measure corresponding to the sum of molar amounts of tDCCA, cDCCA, DBCA and CDCA⁽¹⁰⁾. Statistical comparisons were conducted on the basis of total amounts of metabolites per unit of body weight adjusted to a 12-h excretion period (pmol/kg BW/12 h). Non parametric tests were performed since the distributions of several of the studied metabolites were neither normal nor log-normal, according to the Shapiro-Wilk test, given that some of the participants had high metabolite excretion levels. The Mann-Whitney test for independent samples was used to verify the influence of dichotomic variables documented by questionnaire on the excreted amounts of specific metabolites or

TCA. To assess the influence of factors with more than two groups on the urinary excretion of biomarkers, the Kruskal-Wallis test for independent samples was used. Spearman correlations between two metabolites or between a metabolite and TCA were also verified. All of these tests were performed on the children and adult data separately but also on the combined data from these two populations to increase sample size.

RESULTS

Recruitment and sample characteristics

With regard to the recruitment of participants by mail, 66 letters out of 1889 were returned to us, which corresponds to a proportion of 3.5%. In total, 53% of the targeted households were then reached by phone by one of the members of the research team. Among the eligible participants who initially signed a written consent to participate in the study, 6 adults out of 120 (5.0%) and 3 children out of 52 (5.8%) did not provide a urine sample. After subtraction of the participants with incomplete urine collections, the final sample size represented 1.5% of the child population of the target area and 0.5% of the adult population of the same area. Also, among adult and children participants, the male to female ratio was nearly 1.

In total, 49 children and 114 adults participated in the study. Their characteristics are presented in Table III. Figure 1 shows that, for the adult participants aged between 20 and 69 years old, the random selection of volunteers allowed to obtain a women to men ratio in the different age groups fairly similar to the one found in the population from which

the sample was drawn. The proportion of participants from each targeted municipality was also representative of the relative population density of each municipality (Figure 2).

TABLE III. Characteristics of the Study Subjects

Variable	Adult sample (n = 114)	Child sample (n = 49)
Gender (% female (n))	54 (61)	49 (24)
Age (% (n))		
6-9	n.a. ^A	71 (35)
10-12	n.a. ^A	29 (14)
18-24	3 (3)	n.a. ^A
25-34	18 (21)	n.a. ^A
35-44	23 (26)	n.a. ^A
45-54	29 (33)	n.a. ^A
55-64	24 (27)	n.a. ^A
65-70	4 (4)	n.a. ^A
Highest educational level (% high school or less (n))	45 (51)	22 (9) ^B
Household income (% with income more than 45 000\$CAN/year (n))	67 (70) ^B	74 (32) ^B
Weight in kg (average (range))	75 (50-127)	31 (15-73)
Urinary volume in mL (average (range))	920 (300-1860)	401 (130-1050)
Collection duration in h (average (range))	14.7 (9.5-24.0)	15.0 (11.7-21.3)

^A n.a. = not applicable.

^B This information was not available for all the participants. The % was thus calculated on the basis of the total number of answers for this factor.

FIGURE 1

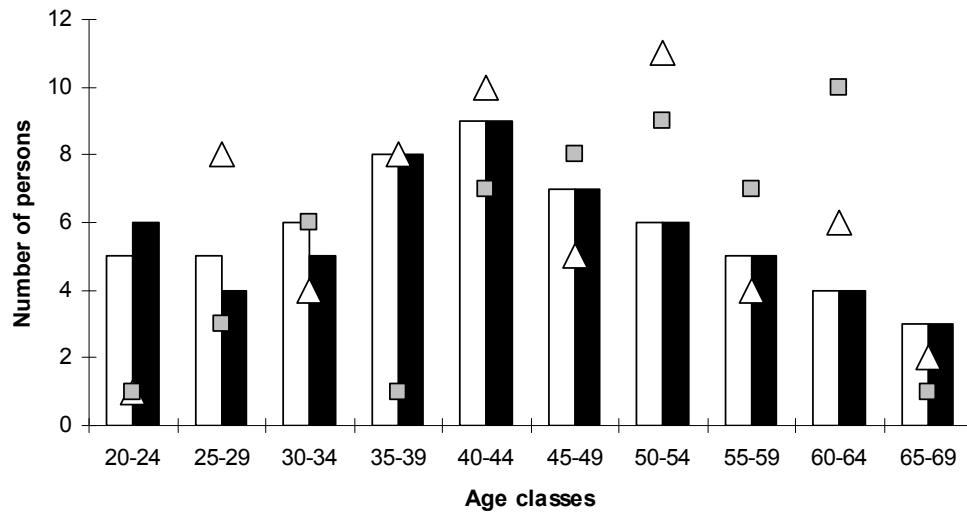


FIGURE 1. Number of volunteers in each age group of the adult population sample, as a function of gender, compared with the expected number based on the actual distribution of the different age groups in the whole population of the studied area and considering a total sample size of 57 women and 57 men. (□ : expected women, ■ : expected men, △ : sampled women, ◻ : sampled men).

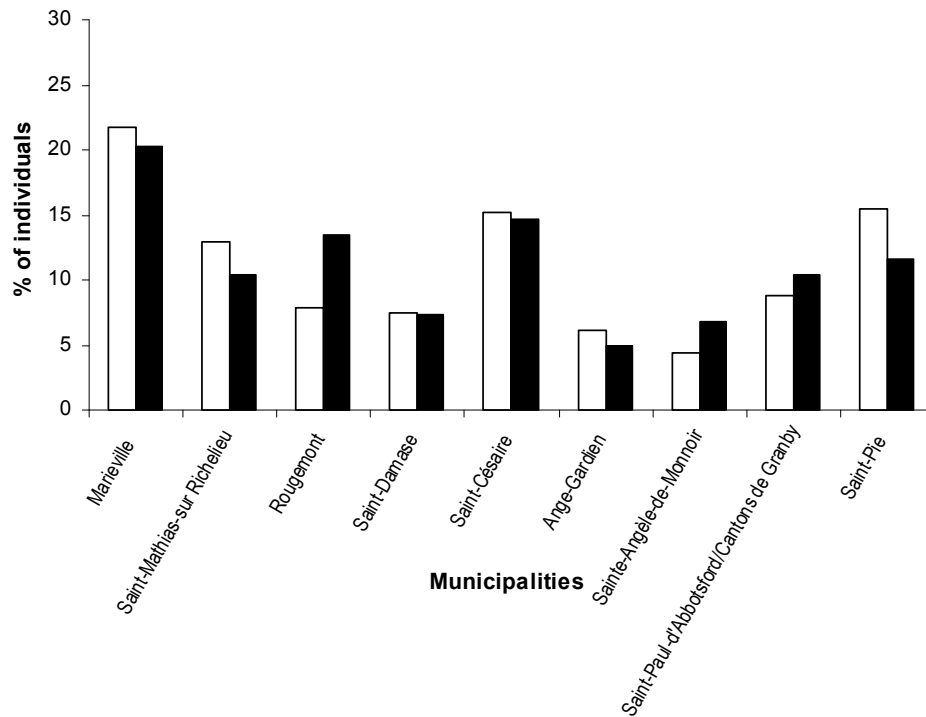
FIGURE 2

FIGURE 2. Proportion (%) of the population of the targeted area and of the obtained sample represented by each municipality (□: expected %, ■: sampled %).

Distribution of the measured metabolites in participating children and adults

Distribution of the six pyrethroid and pyrethrin metabolites measured in the urine of the children under study is shown in Table IV and those determined in adults are presented in Table V. In general, pyrethroid and pyrethrin metabolites found in highest amounts were the same in both adults and children; these were tDCCA, cDCCA and PBA. However, metabolite levels tended to be slightly higher in children than in adults, although the differences were not statistically significant ($p \geq 0.050$).

As presented in Tables IV and V, the proportion of samples with detectable levels of tDCCA, cDCCA, PBA and CDCA appeared adequate to perform comparative statistical analyses for these metabolites. However, for DBCA and FPBA, comparative analysis was considered invalid given the small percentage of detection.

TABLE IV. Distribution of Excreted Amounts of Pyrethroid Metabolites and Total Cyclopropane Carboxylic Acids (TCA) in Children

Metabolite	n detected (%)	minimum	maximum	Amounts (pmol/kg body weight/12 h) ^A				
				percentiles				
				5	25	50	75	95
tDCCA	49(100)	2.66	303	4.42	11.6	19.8	54.2	210
cDCCA	47(95.9)	0.118	97.4	0.464	2.78	6.23	15.2	45.1
PBA	45(91.8)	0.174	250	0.272	5.88	19.5	48.9	150
CDCA	34(69.4)	0.163	31.8	0.207	0.287	2.34	4.63	18.6
DBCA	6(12.2)	0.044	71.5	----	----	----	----	----
FPBA	27(55.1)	0.065	6.75	----	----	----	----	----
TCA	n.a. ^B	5.21	399	8.33	16.0	35.6	93.9	293

^A Incomplete urine voids were excluded.

^B Not applicable.

TABLE V. Distribution of Excreted Amounts of Pyrethroid Metabolites and Total Cyclopropane Carboxylic Acids (TCA) in Adults

Metabolites	n detected (%)	minimum	maximum	Amounts (pmol/kg body weight/12 h) ^A				
				percentiles				
				5	25	50	75	95
tDCCA	108(94.7)	0.165	438	0.946	8.90	15.1	29.9	135
cDCCA	109(95.6)	0.129	122	0.792	3.20	6.07	10.9	54.8
PBA	108(94.7)	0.179	491	0.631	6.34	12.7	26.5	131
CDCA	60(52.6)	0.099	550	0.140	0.322	0.804	3.25	16.3
DBCA	6(5.3)	0.037	16.9	----	----	----	----	----
FPBA	37(32.5)	0.042	23.0	----	----	----	----	----
TCA	n.a. ^B	1.06	563	4.82	14.0	24.7	55.6	207

^A Incomplete urine voids were excluded.

^B Not applicable.

Correlations

The Spearman (r_{hos}) correlation coefficients between two metabolites or between one metabolite and the molar sum of cyclopropane carboxylic acids are as follows. The metabolites tDCCA, cDCCA and PBA were correlated to each other ($r_{\text{s}} = 0.935$ between tDCCA and cDCCA, $p < 0.001$; $r_{\text{s}} = 0.709$ between tDCCA and PBA, $p < 0.001$; $r_{\text{s}} = 0.681$ between cDCCA and PBA, $p < 0.001$). They were also each correlated with total cyclopropane carboxylic acids ($r_{\text{s}} = 0.942$ for the correlation with tDCCA, $p < 0.001$; $r_{\text{s}} = 0.903$ for cDCCA, $p < 0.001$; $r_{\text{s}} = 0.663$ for PBA, $p < 0.001$). However, CDCA was not correlated with tDCCA, cDCCA or PBA ($r_{\text{s}} = 0.078$ with tDCCA, $p = 0.334$; $r_{\text{s}} = 0.023$ with cDCCA, $p = 0.773$; $r_{\text{s}} = 0.096$ with PBA, $p = 0.237$).

Assessment of factors with a potential influence on the amounts of metabolites excreted

When considering the combined adult and children data, most of the associations evaluated between urinary metabolite excretion and the different factors documented by questionnaire (which are susceptible of influencing the excreted amounts of metabolites) were statistically non significant (Table VI). The same results were obtained when children and adults were analyzed separately (data not shown). With regard to the few positive associations, they were significant only for one or two of the metabolites and were not, contrary to what would be expected, significant for the other correlated metabolites. In the other cases, the sample size was too small ($n \leq 8$), which affected the precision and the possibility of concluding in a clear association.

More specifically, the only significant positive associations observed between biomarker levels and factors with a sample size in each subgroup large enough to allow comparisons were the following. When considering the combined data in adults and children, individuals living within 100 m of an orchard showed significantly higher urinary levels of PBA ($p = 0.019$) than those living further than 100 m, but no significant association was observed for the other metabolites ($p \geq 0.236$), including those correlated with PBA (tDCCA and cDCCA). Individuals consuming more than 4 portions of fruits and vegetables a day also exhibited significantly higher levels of PBA ($p = 0.007$) than those eating 1 to 4 portions a day and a trend was observed for cDCCA ($p = 0.076$) but not for tDCCA ($p = 0.269$), which is correlated to the former, nor for CDCA ($p = 0.174$). Similar results with regard to fruit and vegetable ingestion were observed for PBA ($p = 0.024$), cDCCA ($p = 0.078$), tDCCA ($p = 0.215$) and CDCA ($p = 0.640$) in adults only but results were non significant in children. When considering children data only, in the sub-group of children living on a rural road ($n = 19$), statistically higher excretion levels of PBA ($p = 0.028$) were observed compared to the sub-group living in a village ($n = 25$); however, results were non significant for tDCCA ($p = 0.105$), cDCCA ($p = 0.145$) and CDCA ($p = 0.868$).

TABLE VI. Effect of Different Factors on the Urinary Excretion of Pyrethroid Metabolites in Both Adults and Children Combined

Tested factor	n subjects		Statistical significance
Age group	Adults	110	Trend for tDCCA ($p = 0.087$) and CDCA ($p = 0.050$) ^A ; NS ^B for cDCCA and PBA
	Children	45	
Gender	Male	77	NS for all metabolites ^C
	Female	78	
Smoking status (for adults)	Non-smokers	96	NS for all metabolites ^C
	Smokers	14	
Use of medication	No	87	NS for all metabolites ^C
	Yes	68	
Pesticide use around the household	No	129	NS for all metabolites ^C
	Yes	26	
Occupational exposure to pesticides (for adults)	No		$p = 0.005$ for cDCCA ^D ; trend for tDCCA ($p = 0.061$) ^D ; NS ^B for PBA and CDCA
	Yes	69	
		12	
Visits of places where pesticides are used ^E	No		NS for all metabolites ^C
	Yes	133	
Playing on pesticide treated grounds (for children)	No		NS for all metabolites ^C
	Yes	19	
Family member exposed to pesticides at work (for children)	No	37	----- ^F
	Yes	8	
Use of an insect repellent	No	142	NS for all metabolites ^C
	Yes	13	
Recent use of the services of a pest control operator	No	151	----- ^F
	Yes	4	
Use of a treatment for head lice	No	155	n.a. ^G
	Yes	0	
Pet treatment for fleas	No	148	----- ^F
	Yes	7	
Living less than 100 m from an orchard	No		$p = 0.019$ for PBA ^H ; NS ^B for tDCCA, cDCCA and CDCA
	Yes	131	
		18	

Tested factor	n subjects	Statistical significance
Living less than 100 m from an agricultural field	No	
	Yes	NS for all metabolites ^C
	80	
Location of the residence	On a rural road	NS for all metabolites ^C
	In a village	
	89	
Organic diet	No	$p = 0.003$ for PBA ^D and
	Yes	$p = 0.021$ for cDCCA ^D ; NS ^B for tDCCA and CDCA
	91	
	64	
Number of portions of fruits and vegetables ^I	1-4	$p = 0.007$ for PBA ^J ;
	> 4	trend for cDCCA ($p = 0.076$) ^J ;
	101	NS ^B for tDCCA and CDCA
	48	
Number of portions of cereals ^I	1-4	NS for all metabolites ^C
	> 4	
	129	
	20	
Age group (for adults)	18-24	NS for all metabolites ^C
	25-34	
	35-44	
	45-54	
	55-64	
	65-70	
	3	
	21	
	24	
	33	
	25	
	4	

^A Children had statistically significantly higher biomarker levels than adults.

^B NS = non significant, with $p > 0.05$ and no trend.

^C NS for all metabolites = non significant association for the four main pyrethroid metabolites (tDCCA, cDCCA, PBA and CDCA) with $p > 0.05$ and no trend.

^D Effect contrary to what is expected, i.e. the group that answered positively to being exposed to the factor showed lower biomarker levels.

^E Includes fruit picking, the visit of a botanical garden, a greenhouse, a farm or any other public place where pesticides can be used.

^F Insufficient power (n too small: ≤ 8) to draw conclusions.

^G n.a. = not applicable.

^H The group of participants who answered “Yes” had higher biomarker levels than the group that answered “No”.

^I Analysis was conducted according to two sub-groups only to ensure a sufficient sample size in each group.

^J Individuals eating >4 portions of fruits and vegetables per day exhibited higher levels of this biomarker than those eating 1-4 portions of fruits per day.

DISCUSSION

This study allowed to obtain an estimation of exposure to pyrethroids and pyrethrins in an agricultural rural population of the Province of Quebec, through measurements of amounts of biomarkers excreted in urine (pmol/kg BW/12 h). The four metabolites found in

highest concentrations in both adults and children, tDCCA, PBA, cDCCA and CDCA, are indicative of an exposure mainly to permethrin, cypermethrin and natural pyrethrins (see Table I). These results are similar to those obtained in a biomonitoring study performed under a similar design but in an urban population of the Province of Quebec, Canada, the Montreal Island⁽¹⁰⁾. They are also consistent with those obtained by Bradman et al.⁽⁵⁾ who reported an exposure mainly to permethrin and cypermethrin in children of farmers according to environmental monitoring data on pyrethroids in house dust, surface wipes, clothing, and indoor and outdoor air.

The current study also showed that urinary amounts of the different pyrethroid and pyrethrin metabolites adjusted per unit of body weight tended to be slightly higher in children than in adults, although the difference was statistically non significant. The National Research Council⁽¹⁷⁾ considers that children are proportionally more exposed to pesticides through the diet than adults. The data gathered by questionnaire in our study suggest that this tendency towards slightly higher levels of pyrethroid and pyrethrin metabolites in children urine compared to adults could be related to a greater intake of fruits and vegetables per unit of body weight in children. In fact, it was documented by questionnaire in the present study that the average daily intake of fruits and vegetables, as well as cereals and meat, were similar between children and adults, which results in a proportionally larger intake of these food items per unit of body weight in children.

Although the diet is generally considered the main source of exposure to pyrethroids⁽⁴⁾, Lu et al.⁽¹⁸⁾ rather concluded that residential exposure, through indirect ingestion, was responsible for a greater proportion of children exposure. In the case of pyrethroids, their registration for residential use indoors and outdoors⁽¹⁹⁾ also favors

exposure through dermal contact with treated surfaces or dust. Dermal exposure may be more important in children than in adults due to their frequent contact with soil and the fact that their skin is more permeable to lipophilic substances than that of adults⁽²⁰⁾. In individuals living near agricultural areas with known aerial applications of pesticides, airborne exposure is also possible although pyrethroids are not very volatile⁽¹⁾; however, following an application, soil adsorption of pyrethroid particles may occur, thus limiting their dispersion and possibly explaining the presence of deposited residues⁽¹⁾. This could suggest an additional contribution of the dermal route in individuals living near a spreading area, particularly in children.

Nonetheless, the available kinetic data in volunteers exposed under controlled conditions, either through the cutaneous or the oral route, indicate that the oral absorption fraction of pyrethroids is much higher than the dermal absorption fraction. Cutaneous exposure thus needs to be considerably larger (at least 15 times) than oral exposure to contribute significantly to the absorbed dose of pyrethroids. In the case of cypermethrin, one of the pyrethroids to which our population appears to be the most exposed, Woollen et al.⁽²¹⁾ observed that only 0.85-1.8% of a dermal cypermethrin dose was recovered as DCCA in the urine of six volunteers during the 120-h period following application as compared to 27-57% after an oral administration.

Possible associations between the urinary excretion of the various pyrethroid metabolites and the different potential sources of exposure documented by questionnaire (geographic location, personal factors, life-habits, dietary intake) were tested in adults, in children and in the two groups combined (see Table VI). Most associations were non significant; there were a few positive associations for some metabolites but they were not

consistent with the results obtained for the other correlated metabolites, contrary to what would be expected considering that the three main metabolites observed in the urine of the participants, tDCCA, cDCCA and PBA, originate from the biotransformation of the most commonly used pyrethroids in Quebec. Given the number of statistical comparisons performed, the significant outcomes could also be attributable to chance alone. Otherwise, for some of the documented factors – *i.e.* the use of an exterminator service, use of an insect repellent and treatment of pets for fleas – the studied adult and children population reported such exposure sporadically ($n \leq 8$). Therefore, statistically significant associations could not be established with confidence. In children specifically, the sample size was also too small to allow the detection of an effect for the following factors: visit of a place where pesticides are used (such as fruit picking), living with a person occupationally exposed to pesticides and living close to an orchard. Nonetheless, Belleville et al.⁽²²⁾ showed that, during the period of insecticide spreading, children living less than 30 meters from an orchard were more exposed than those living more than 200 meters from an orchard. With regard to the use of head lice shampoos, no individual reported such use. In the similarly designed study conducted in Montreal⁽¹⁰⁾, except for the use of medication and tobacco smoke in adults as well as treatment against head lice in children, no consistent significant associations were observed between the different factors documented by questionnaire (gender, use of an insect repellent,...) and the excretion of the various pyrethroid metabolites. The relation with medication however was not maintained when men and women were analyzed separately. Furthermore, the significantly lower urinary excretion of tDCCA and cDCCA in smokers compared to non-smokers was also observed when considering men only but was less clear for women analyzed separately.

In the study of Fortin et al.⁽¹⁰⁾, it was shown that levels of exposure to pyrethroids were similar to those found in urban areas of other industrialized countries such as Germany⁽³⁾ and the USA⁽²³⁾. For the rural area, published data are limited. However, in children of a rural area, Becker et al.⁽⁶⁾ reported urinary concentrations of tDCCA, cDCCA and PBA similar to those obtained in the current study. Also, our study shows adult levels of PBA, expressed in nmol/day, similar to those obtained in the study of Saieva et al.⁽²⁴⁾. On the other hand, Curwin et al.⁽²⁵⁾ noted a detection frequency of pesticides in house dust higher in agricultural sectors than in non agricultural areas. This could be explained by the proximity of application areas and by the contamination of clothing and shoes by outdoor residues in individuals living in rural areas^(25,26).

Although the results presented in this article are similar to those reported elsewhere, the ratio of tDCCA to cDCCA is slightly higher than what would be expected from the chemical ratio of isomers in formulations available on the market (*trans/cis* ratio of 60:40 up to 75:25). This may be explained in part by differences in the biodisposition of the *cis* and *trans* isomer^(21,27-30) as well as route-to-route differences⁽²¹⁾. In particular, the data of Woollen et al.⁽²¹⁾ indicate that total amounts of tDCCA over a 5-day period following an oral exposure to cypermethrin (*trans/cis* ratio of 50:50) in volunteers (where excretion appears complete) was on average about twice higher than those of cDCCA. These authors also reported that orally exposed individuals excreted relatively less of the *cis* form of the metabolite than topically exposed individuals, suggesting differences in the biodisposition of the isomers depending on the route of exposure. The photo-isomerization (*cis* to *trans* conversion and vice-versa)⁽³¹⁾ and differential biodegradation of the parent compounds⁽³²⁾ that may occur in the environment could also contribute to explain differences in formulation ratios of *cis* and *trans* isomers compared to biological ratios.

Lower amounts of PBA were further observed in the present study as compared to tDCCA and cDCCA. This is attributable to the fact that the cleavage of the ester bond of pyrethroids such as permethrin and cypermethrin and the action of the alcohol and aldehyde dehydrogenase leads not only to the quantified 3-phenoxybenzoic acid but also phenoxybenzoic alcohol and phenoxybenzoic aldehyde, which were not quantified in our study⁽³²⁾. Hence, the biotransformation of the parent compound yields 1 mol of DCCA and 1 mol of phenoxybenzoic derivatives but not only PBA.

Overall, this study allowed to obtain data on the distribution of exposure to pyrethroids in adults and children living in a rural area of Quebec based on measurements of urinary biomarkers. Although the diet is generally considered the main source of exposure to pesticides in the general population, this study did not allow to clearly identify factors that contribute the most to the observed biomarker variations in the studied adults and infantile population. The use of a self-administered questionnaire does not appear as the most suitable tool to document exposure through different sources. Further research should include environmental and personal sampling in order to obtain a better assessment of the sources of exposure.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are very grateful to Drs A. Charette and W. Lin for the synthesis of CDCA. We also address our gratitude to all the participants and to the team of the *Agence de la santé et des services sociaux de la Montérégie* for its contribution and help with the field work. This study was funded by the *Institut national de santé publique du Québec*.

REFERENCES

1. **Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR):** *Toxicological profile for pyrethrins and pyrethroids*. Atlanta: U.S. Public Health Service, 2003.
2. **Valcke, M., O. Samuel, M. Bouchard, et al.:** Biological monitoring of exposure to organophosphorus insecticides in children living in peri-urban areas of the Province of Quebec, Canada. *Int.Arch. Occup. Environ. Health* 79(7):568-577 (2006).
3. **Heudorf, U., and J. Angerer:** Metabolites of pyrethroid insecticides in urine specimens: current exposure in an urban population in Germany. *Environ. Health. Perspect.* 109:213-217 (2001).
4. **Schettgen, T., U. Heudorf, H. Drexler, and J. Angerer:** Pyrethroid exposure of the general population – is this due to diet? *Toxicol. Lett.* 134:141-145 (2002).
5. **Bradman, A., D. Whitaker, L. Quiros, et al.:** Pesticides and their Metabolites in the Homes and Urine of Farmworker Children Living in the Salinas Valley, CA. *J. Exp. Sci. Environ. Epidemiol.* 17:331-349 (2007).
6. **Becker, K., M. Seiwert, J. Angerer, et al.:** GerES IV Pilot Study: Assessment of the exposure of German children to organophosphorus and pyrethroid pesticides. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 209:221-233 (2006).
7. **Soderlund, D.M., J.M. Clark, L.P. Sheets, et al.:** Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology* 171:3-59 (2002).
8. **Leng, G., K.H. Kühn, and H. Idel:** Biological monitoring of pyrethroids in blood and pyrethroid metabolites in urine: applications and limitations. *Sci. Total. Environ.* 199:173-181 (1997).

9. **Bouchard, M., G. Carrier, R.C. Brunet, P. Duma, and N. Noisel:** Biological Monitoring of Exposure to Organophosphorous Insecticides in a Group of Horticultural Greenhouse Workers. *Ann. Occup. Hyg.* 50(5):505-515 (2006).
10. **Fortin, M.C., M. Bouchard, G. Carrier, and P. Dumas:** Biological monitoring of exposure to pyrethrins and pyrethroids in a metropolitan population of the Province of Quebec, Canada. *Environ. Res.* 107:343-350 (2008).
11. **Scher, D.P., B.H. Alexander, J.L. Adgate, et al.:** Agreement of pesticide biomarkers between morning void and 24-h urine samples from farmers and their children. *J. Exp. Sci. Environ. Epidemiol.* 17:350-357 (2007).
12. **Statistics Institute of Quebec (Institut de la statistique du Québec):** “Apple production and marketing, by orchard areas, Quebec, 2004 picking season (Production et mise en marché de la pomme, par région pomicole, Québec, récolte 2004).” [Online] Available at http://www.stat.gouv.qc.ca/donstat/econm_finnc/filr_bioal/culture/pomme/a_k112004.htm (Accessed April, 2, 2006).
13. **Department of Agriculture, Fisheries and Food of Quebec (Ministère de l’agriculture, des pêcheries et de l’alimentation du Québec (MAPAQ)):** “Regional profile of agricultural food industry in Quebec. (Profil régional de l’industrie agroalimentaire au Québec).” [Online] Available at <http://www.mapaq.gouv.qc.ca/NR/rdonlyres/1626D5B8-09FB-40B4-8A9C-4E1133D240BD/0/PR16.pdf> (Accessed April, 15, 2006).
14. **Public Health Agency of Canada:** “Definitions of “rural” Summary.” [Online] http://www.phac-aspc.gc.ca/rh-sr/paper_f.html (Accessed April, 15, 2006).
15. **Ministry of Municipal Affairs and Regions (Ministère des affaires municipales et des régions (MAMR)):** “Municipalities Court List (Répertoire des

- municipalités.” [Online] Available at <http://www.mamr.gouv.qc.ca/> (Accessed April, 15, 2006).
16. **Leng, G., W. Gries, and S. Selim** : Biomarker of pyrethrum exposure. *Toxicol. Lett.* 62:195-201 (2006).
17. **National Research Council (NRC)**: *Pesticides in the Diets of Infants and Children*. Washington: National Academy Press, 1993.
18. **Lu, C., D.B. Barr, M. Pearson, S. Bartell, and R. Bravo**: A Longitudinal Approach to Assessing Urban and Suburban Children’s Exposure to Pyrethroid Pesticides. *Environ. Health. Perspect.* 114(9):1419-1423 (2006).
19. **Health Canada**: “Product Information.” [Online] http://pr-rp.pmra-arla.gc.ca/portal/page?_pageid=34,1&_dad=portal&_schema=PORTAL (Accessed May, 30, 2007).
20. **West, P., S. Worobee, and L.M. Solomon**: Pharmacology and toxicology of infant skin. *J. Invest. Dermatol.* 76:147-150 (1981).
21. **Woollen, B.H., J.R. Marsh, W.J.D. Laird, and J.E. Lesser**: The metabolism of cypermethrin in man: differences in urinary metabolite profiles following oral and dermal administration. *Xenobiotica* 22:983-991 (1992).
22. **Belleville, D., D. Boudreault, and G. Carrier**: *Health risk analysis associated with the exposure to organophosphates used in orchards of the Montérégie (Analyse des risques à la santé associés à l'exposition aux organophosphorés utilisés dans les vergers de la Montérégie)*. Gouvernement of Quebec, 1997.
23. **Centers for Disease Control (CDC)**: *Third National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals*. Georgia: National Center for Environmental Health, 2005.

24. **Saieva, C., C. Aprea, R. Tumino, et al.:** Twenty-four-hour urinary excretion of ten pesticide metabolites in healthy adults in two different areas of Italy (Florence and Ragusa). *Sci. Total Environ.* 332:71-80 (2004).
25. **Curwin, B.D., M.J. Hein, W.T. Sanderson, et al.:** Urinary pesticide concentrations among children, mothers and fathers living in farm and non-farm households in Iowa. *Ann. Occup. Hyg.* 51(1):53-65 (2007).
26. **Bouvier, G., N. Seta, A. Vigouroux-Villard, O. Blanchard, and I. Momas:** Insecticide urinary metabolites in nonoccupationally exposed populations. *J. Toxicol. Environ. Health* 8(Part B):485-512 (2005).
27. **Crawford, M.J., A. Croucher, and D.H. Hutson:** Metabolism of cis- and trans cypermethrin in rats. Balance and tissue retention study. *J. Agri. Food Chem.* 29:130-5 (1981).
28. **Gotoh, Y., M. Kawakami, N. Matsumoto et al. :** Permethrin emulsion ingestion: clinical manifestation and clearance of isomers. *Clin. Toxicol.* 36:57-61 (1998).
29. **Eadsforth, C.V., and M.K. Baldwin:** Human dose-excretion studies with the pyrethroids insecticide cypermethrin. *Xenobiotica* 13:67-72 (1983).
30. **Eadsforth, C.V., P.C. Bragt, and N.J. van Sittert:** Human dose-excretion studies with the pyrethroid insecticides cypermethrin and alphacypermethrin: relevance for biomonitoring. *Xenobiotica* 18:603-14 (1988).
31. **Holmstead, R.L., J.E. Casida, and L.O. Ruzo:** *Photo- chemical reactions of pyrethroid insecticides.* In: Synthetic Pyrethroids (ACS Symposium Series, No. 42). American Chemical Society, Washington, D. C., 1977.
32. **Liu, W., J.J. Gan, S. Lee, and I. Werner:** Isomer selectivity in aquatic toxicity and biodegradation of cypermethrin. *J. Agric. Food Chem.* 52(20):6233 -6238 (2004).

33. **Choi, J., R.L. Rose, and E. Hodgson:** In vitro metabolism of permethrin: the role of human alcohol and aldehyde dehydrogenases. *Pesticides Biochem. Physiol.* 73:117-28 (2002).

Contribution des auteurs

Caroline Couture : a contribué à l'adaptation du projet, a adapté la demande au comité d'éthique et la documentation pour les participants, a supervisé et organisé la collecte de données sur le terrain, a contribué à l'analyse statistique et à l'interprétation des résultats et a rédigé le manuscrit original

Marie-Chantale Fortin : a rédigé les documents originaux (demandes de subvention et éthique, documentation), a contribué aux analyses statistiques, à l'interprétation des résultats et à la révision du manuscrit original et a effectué les révisions du manuscrit et les analyses statistiques supplémentaires.

Gaétan Carrier : a contribué à l'adaptation du projet, à l'interprétation des résultats et à la révision du manuscrit original

Pierre Dumas : a effectué les analyses biochimiques et apporté des détails sur la partie analytique dans la section matériel et méthode du manuscrit original

Claude Tremblay : a contribué à l'adaptation du projet et à la révision du manuscrit original, a promu le projet auprès des populations ciblées et fourni des ressources matérielles et humaines

Michèle Bouchard : a contribué à l'adaptation du projet, a révisé les adaptations des documents originaux, a contribué aux analyses statistiques, à l'interprétation des résultats et a révisé le manuscrit original et toutes ses révisions

Comparaison de l'excrétion urinaire de biomarqueurs d'exposition aux pyréthrinoïdes et aux pyréthrines chez les résidents de régions urbaine et rurale de la Province de Québec, Canada³

Comparison of the urinary excretion of biomarkers of exposure to pyrethroids and pyrethrins between residents of urban and rural areas of the Province of Quebec, Canada

M. C. Fortin, M. Bouchard*, G. Carrier

Département de santé environnementale et santé au travail, Université de Montréal.

*Adresser les correspondances à : Michèle Bouchard

Département de santé environnementale et santé au travail, Université de Montréal, C.P. 6128, succ. Centre-Ville, H3C 3J7.

Tel : 514-343-6111 ext. 1640

Fax : 514-343-2220

michele.bouchard@umontreal.ca

Titre courant : Pyréthrinoïdes en milieu urbain et rural

³ Article soumis à la Revue d'épidémiologie et de santé publique.

Abstract

Background

Residents of rural (agricultural) areas are often suspected of being exposed to higher levels of pesticides than residents of urban areas. However, only a limited number of studies have specifically evaluated the impact of the geographical area of residence on pyrethroid and pyrethrin exposure in the general population. This study aimed at comparing the levels of biomarkers of exposure between urban and rural, adult and children, populations of the Province of Quebec, Canada.

Methods

A total of 154 urban (Montreal) and 154 rural (Monteregie) participants provided a complete overnight timed-urine collection and filled a self-administered questionnaire. Urine samples were analyzed for pyrethroid and pyrethrin metabolites: *cis*- and *trans*-dichloro- and *cis*-dibromo- vinyl dimethylcyclopropane carboxylic acids, phenoxy- and fluorophenoxy- benzoic acids and chrysanthemum dicarboxylic acid. Amounts of metabolites (pmol/12 h/kg bw) and their frequency of detection in the two populations were compared and interpreted with the help of the answers gathered by questionnaire.

Results

The Tukey M-estimators showed that adults and children from the rural area excreted higher levels of the main urinary metabolites, the *cis*- and *trans*-dichlorovinyl dimethylcyclopropane carboxylic acids and the phenoxybenzoic acids, than those living in the urban area. However, a significant difference was only observed for the phenoxybenzoic acid ($p = 0.020$ for children and adults taken together; $p = 0,082$ for

children only and $p = 0,052$ for adults only). The dibromovinyl dimethylcyclopropane carboxylic acid and the fluorophenoxybenzoic acid metabolites were poorly detected but the relative frequency of detection of the fluorophenoxybenzoic acid metabolite was higher ($p < 0,001$) in the rural population.

Conclusion

The presence of a baseline level of biomarkers in the urban and rural population confirms the ubiquity of pyrethroids and pyrethrins in the environment. However, in the rural adult and infantile population under study, other factors possibly contributed to slightly increase exposure compared to the urban population, namely the use of mosquito repellents and household insecticides as reported by questionnaire.

Keywords

Pyrethroids. Pyrethrins. Exposure. Urine. Biomarker. Urban. Rural.

Abrégé

Position du problème

Il est souvent présumé que les habitants de régions rurales soient exposés à des niveaux plus élevés de pesticides que les habitants de régions urbaines. Or, un nombre limité d'études ont évalué l'impact de la zone d'habitation sur l'exposition aux pyréthrinoïdes et aux pyréthrinés dans la population générale. La présente étude avait pour objectif de comparer les niveaux de biomarqueurs d'exposition entre des populations urbaine et rurale, adulte et infantile, de la Province de Québec, Canada.

Méthodes

Un total de 308 participants, soit 154 de l'Ile de Montréal et 154 de la Montérégie, ont fourni, en période estivale, une collecte urinaire nocturne minutée et complété un questionnaire auto-administré. Les échantillons urinaires ont été analysés pour quantifier les métabolites des pyréthriinoïdes et des pyréthrines suivants : les acides *trans*- et *cis*-dichloro- et *cis*-dibromo- vinyl diméthyle cyclopropanoïque, les acides phénoxy- et fluorophénoxy- benzoïques et l'acide carboxylique chrysanthémum dioïque. Les quantités de métabolites (exprimées en pmol/12 h/kg pc) et leur fréquence de détection dans les deux populations ont été comparées et interprétées à l'aide des réponses fournies par questionnaires.

Résultats

Les estimations de tendance centrale Tukey ont montré que les adultes et les enfants du milieu rural présentaient des niveaux plus élevés des principaux métabolites urinaires, les acides *trans*- et *cis*- dichlorovinyl diméthyle cyclopropanoïque et l'acide phénoxybenzoïque, que ceux demeurant en milieu urbain. Une différence significative n'était toutefois observée que pour l'acide phénoxybenzoïque ($p = 0,020$, lorsque les adultes et enfants étaient combinés et $p = 0,082$ chez les enfants seulement et $p = 0,052$ chez les adultes seulement). Les métabolites acides dibromovinyl diméthyle cyclopropanoïque et fluorophénoxybenzoïque étaient peu détectés dans les deux populations mais la fréquence relative de détection de l'acide fluorophénoxybenzoïque était plus grande dans la population rurale ($p < 0,001$).

Conclusion

La présence d'un niveau de base de biomarqueurs dans les populations des milieux urbain et rural confirme l'ubiquité des pyréthriinoïdes et pyréthrines dans l'environnement. Cependant, dans la population rurale adulte et infantile à l'étude, d'autres facteurs ont possiblement contribué à augmenter légèrement l'exposition par rapport à la population urbaine, notamment, selon les réponses aux questionnaires, l'utilisation plus abondante de chasse-moustiques et de pesticides domestiques.

Mots clés

Pyréthriinoïdes. Pyréthrines. Exposition. Urine. Biomarqueurs. Urbain. Rural.

1. Introduction

Les pesticides sont utilisés de façon ubiquiste en agriculture de sorte que les habitants de régions rurales et agricoles sont souvent considérés plus exposés aux pesticides que ceux vivant en région urbaine. Les études qui ont effectué une comparaison systématique des niveaux urinaires de métabolites de pyréthriinoïdes selon le milieu de résidence sont rares.

Saieva et al. [1] ont comparé les quantités journalières de métabolites de pesticides excrétées dans l'urine d'adultes demeurant en milieu urbain ou rural en Italie. Ils avaient mesuré de nombreux métabolites d'insecticides organophosphorés, mais seulement l'acide phénoxybenzoïque (PBA) comme métabolite de pyréthriinoïdes, et n'avaient pas observé de différence significative dans les niveaux de ce dernier métabolite selon le milieu.

Becker et al. [2] ont aussi comparé les concentrations urinaires (ajustées ou non pour la créatinine) de divers métabolites de pyréthriinoïdes mesurés dans des urines ponctuelles d'enfants vivant en région urbaine ou rurale en Allemagne. Ils ont observé une différence significative dans l'excrétion des acides *trans*- et *cis*- dichlorovinylldiméthyle cyclopropanoïque (tDCCA et cDCCA, respectivement) et du PBA selon le milieu. Toutefois, il a récemment été démontré que l'emploi de concentrations ($\mu\text{g/L}$; $\mu\text{g/g}$ de créatinine) peut entraîner des divergences dans les résultats de comparaisons entre différentes populations par rapport à ceux obtenus sur la base de quantités excrétées sur une période de 12 heures ou plus [3].

L'objectif de la présente étude était de comparer l'exposition aux pyrétrhines et aux pyrétrhinoïdes, entre des populations québécoises urbaine et rurale, adulte et infantile, en utilisant comme bioindicateur d'exposition la quantité de métabolites excrétée dans l'urine.

2. Matériel et méthodes

Les protocoles de recherche en milieu urbain et rural ont été approuvés par le Comité d'éthique de la recherche de la Faculté de Médecine de l'Université de Montréal. Chaque participant a été rencontré à son domicile par un membre de l'équipe de recherche afin de lui expliquer le protocole, le questionnaire et le formulaire de consentement ainsi que de lui remettre le matériel de collecte. Tous les participants ont donné, par écrit, leur libre consentement après avoir reçu de l'information orale et écrite sur l'utilité et les implications de l'étude. Les participants pouvaient se retirer de l'étude à leur gré sans préjudice. Dans le cas des enfants, l'assentiment de l'enfant a été obtenu en plus du consentement du parent.

Les données présentées dans cette étude s'insèrent dans un projet visant à caractériser l'exposition aux pyréthrinoïdes et aux pyréthrines dans la population québécoise résidant dans différents milieux. Le même devis expérimental a été utilisé pour les divers volets de l'étude. Les résultats spécifiques à chaque zone de résidence ont fait l'objet de publications respectives [4, 5].

2.1 Échantillonnage des populations à l'étude

Un recrutement aléatoire par téléphone a été effectué sur le territoire de l'Île de Montréal pour recruter 240 participants. Sur le territoire de la Montérégie, un recrutement aléatoire a aussi été effectué à partir d'une liste des noms et adresses de 10 municipalités rurales, ce qui a permis de recruter 172 participants. Deux groupes d'âge étaient visés : des enfants âgés entre 6 et 12 ans et des adultes âgés de plus de 18 ans.

2.2 Collecte urinaire et questionnaires

La collecte urinaire s'est effectuée lors de deux étés consécutifs, soit en août-septembre 2005 à Montréal et en juin-juillet-août 2006 en Montérégie. Les participants devaient recueillir toutes leurs urines excrétées entre 18 h 00 et le lever du lendemain matin en incluant la miction au lever, soit une période d'au moins 12 heures. Ils devaient aussi noter l'heure précise de la dernière miction précédant le début de la collecte urinaire et l'heure précise de la miction au lever afin d'avoir le temps total d'accumulation. Les participants ont aussi fourni, au moyen d'un questionnaire auto-administré, des informations de nature démographique et personnelles ainsi que des facteurs d'exposition potentiels tel que présenté au tableau 1.

Tableau 1. Facteurs d'exposition potentielle et personnels documentés par questionnaire

• Âge (années)	• Consommation de produits céréaliers ^b
• Sexe (homme – femme)	• Utilisation d'un traitement contre les poux ^a
• Poids (kg)	• Utilisation d'un traitement contre les puces ^a
• Taille (m)	• Visite de lieux potentiellement contaminés ^a
• Indice de masse corporelle (kg/m ²)	• Recours à un exterminateur ^a
• Utilisation d'ibuprofen ^a	• Traitement à l'extérieur de la maison ^a
• Utilisation d'autres médicaments ^a	• Utilisation d'insecticide domestique ^a (RAID™ par exemple)
• Utilisation de produits de tabac ^b	• Utilisation de chasse-moustique ^a
• Consommation d'alcool ^b	• (OFF™ par exemple)
• Consommation de viandes ^b	• Consommation d'aliments certifiés biologiques ^a
• Consommation de produits laitiers ^b	• Pourcentage de l'alimentation étant certifiée biologique
• Consommation de fruits et légumes ^b	

^a Variable dichotomique (oui – non)

^b Variable numérique discrète (nombre de cigarettes, nombre de consommation alcoolisées, nombre de portion de viande, produits laitiers, fruits et légumes et produits céréaliers)

^c Variable catégorique à 5 niveaux correspondant aux intervalles de pourcentage suivants : <15%; 15 à 45%; 46 à 65%; 66 à 85% et >85%

2.3 Traitement des échantillons d'urine

Le volume total d'urine produit par chaque participant a été mesuré aussi rapidement que possible puis une partie de l'échantillon (± 100 mL) a été aliquotée et congelée. Ces aliquotes ont été envoyées, congelées, au Laboratoire de toxicologie humaine de l'Institut national de santé publique du Québec. Les métabolites suivants ont été mesurés : les acides *trans*- et *cis*-3-(2,2-dichlorovinyle)-2,2-diméthylecyclopropanoïque (tDCCA et cDCCA), l'acide 3-phénoxybenzoïque (PBA), l'acide chrysanthémumdioïque (CDCA), l'acide 4-fluoro-3-phénoxybenzoïque (FPBA) et l'acide *cis*-3-(2,2-dibromovinyle)-2,2-diméthylecyclopropanoïque (DBCA). L'approche utilisée pour l'analyse, décrite en détails d'autres articles [4-5], est une adaptation de celle publiée par Leng et Gries [6]. Le tableau 2 présente les pyréthrinoïdes et pyréthrines précurseurs de chacun des métabolites.

Tableau 2. Métabolites des pyréthriinoïdes et leurs précurseurs

Métabolites	Composé parent (précurseur)
<i>t</i> DCCA et <i>c</i> DCCA	Cyfluthrine, Cyperméthrine, Perméthrine
PBA	Cyhalothrine- λ , Cyperméthrine, Deltaméthrine, Esfenvalérate ^a , Fenpropathrine ^a , Flucythrinate ^a , Fluvalinate, Perméthrine, Phénothrine
CDCA	Resméthrine, Alléthrine, Phénothrine, Pralléthrine, Tetraméthrine, Pyréthrines naturelles (un mélange de : cinérine 1&2, jasmoline 1&2 and pyréthrine 1&2)
DBCA	Deltaméthrine
FPBA	Cyfluthrine, Fluméthrine ^a

^aNon homologué au Canada

2.4 Analyse des données

La quantité de chaque métabolite excrétée dans l'urine (pmol), ajustée pour la durée (12 h) et le poids corporel (kg pc) a été utilisée comme indice d'exposition. Les analyses descriptives de ces données biologiques ont été réalisées avec le programme Excel de Microsoft. Pour chaque sous-groupe d'échantillon, les moyennes arithmétique et géométrique, les centiles (5, 10, 50, 75, 90, 95^e), l'étendue, l'écart type et l'erreur type ont été déterminés.

Les analyses statistiques comparatives ont été effectuées avec le programme SPSS pour Windows version 13.0. L'estimateur robuste de tendance centrale Tukey a été calculé afin d'aider à l'interprétation des données biologiques (valeurs d'excrétion de métabolites en pmol/12 h/kg pc) selon le milieu (urbain ou rural); contrairement à d'autres valeurs de tendance centrale, l'estimateur Tukey Biweight est peu sensible à une déviation de la distribution par rapport à la normale.

Des tests de Mann-Whitney ont aussi été effectués pour comparer la fréquence de détection de chaque métabolite entre les échantillons urbain et rural (adultes et enfants ensemble ou séparés) en considérant de façon dichotomique le niveau de chaque métabolite dans l'urine (i.e. > ou < que la limite de détection). Ensuite, pour les métabolites dont la fréquence de détection étaient >70% dans le groupe, c'est-à-dire pour le tDCCA, le cDCCA et le PBA, d'autres tests de Mann-Whitney ont été effectués sur les valeurs d'excrétion en pmol/12 h/kg pc pour déterminer s'il y avait une différence significative dans l'excrétion urinaire des biomarqueurs d'exposition entre les groupes (adultes et enfants ensembles et séparés) vivant en milieu urbain et rural. Des tests non-paramétriques ont été choisis parce que la distribution des métabolites ne correspondait pas une distribution normale ou log-normale (tel que vérifié par des tests de Shapiro-Wilk).

Pour les échantillons urinaires dont la concentration des métabolites était inférieure au seuil de détection analytique, la moitié de la limite de détection a été utilisée comme concentration dans le calcul des valeurs d'excrétion en pmol/12 h/kg pc. Les analyses ont aussi été réalisées en incluant et en excluant les individus ayant rapporté une exposition professionnelle aux pesticides (n = 12). Enfin, des tests de Mann-Whitney ont été employés afin de vérifier s'il y avait des différences significatives dans la fréquence rapportée des éléments documentés par questionnaire (tableau 1) entre les échantillons urbain et rural.

3. Résultats

3.1 Caractéristiques des échantillons

Des 240 individus initialement recrutés sur l'Île de Montréal (échantillon urbain), 154 individus, soit 73 adultes âgés de 20 à 64 ans et 81 enfants âgés de 6 à 12 ans, ont complété adéquatement la collecte urinaire et le questionnaire et ont été inclus dans cette étude. Des 172 individus recrutés dans des municipalités de la Montérégie (échantillon rural), 154 individus, soit 110 adultes âgés de 20 à 69 ans (dont 12 ont rapporté l'utilisation de pesticides dans le cadre de leur emploi) et 44 enfants âgés de 6 à 12 ans ont complété adéquatement l'étude. La figure 1 décrit plus en détails les caractéristiques démographiques des échantillons de population.

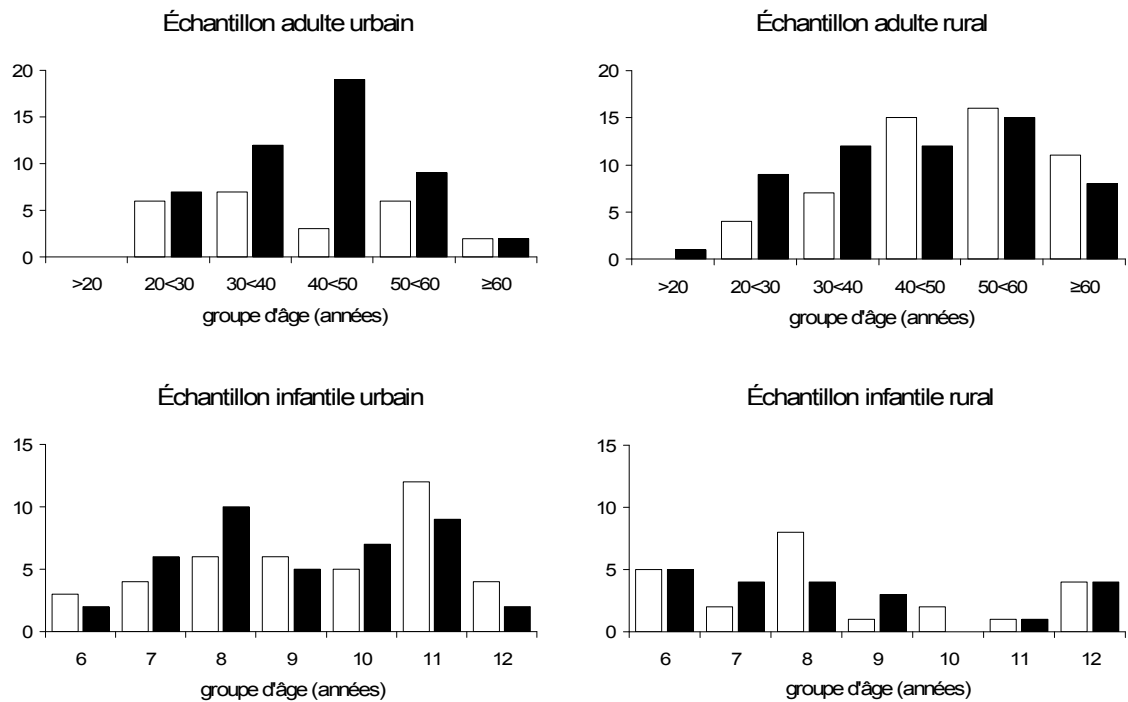


Figure 1. Distribution des âges selon le sexe (□ homme ou garçon; ■ femme ou fille) dans les différents groupes de la population.

3.2 Fréquence de détection des métabolites

La fréquence de détection du tDCCA, du cDCCA et du PBA était supérieure ou égale à 91%, tant en milieu rural qu'en milieu urbain, tant chez les adultes que chez les enfants (tableau 3). Pour le CDCA, le FPBA et le DBCA, les pourcentages de détection étaient respectivement de 66, 52 et 11% chez les enfants et 59, 34 et 15% chez les adultes en milieu rural alors qu'ils étaient de 75, 16 et 14% chez les enfants et 34, 8,1 et 11% chez les adultes en milieu urbain. Le pourcentage de détection du FPBA était en fait plus élevé de façon statistiquement significative dans l'échantillon rural, que les adultes et enfants soient considérés séparément ou ensemble et que les adultes ayant rapporté une exposition professionnelle soient inclus ou non (valeurs $p < 0,001$). Le CDCA a aussi été détecté relativement plus fréquemment chez les adultes de l'échantillon rural ($p = 0,004$).

3.3 Niveaux des biomarqueurs d'exposition

Les niveaux des biomarqueurs d'exposition chez les individus résidant en milieu rural ont été comparés à ceux des individus vivant en milieu urbain. Le tableau 3 présente la distribution des quantités (pmol/12 h/kg pc) de biomarqueurs d'exposition aux pyréthrinoïdes (tDCCA, cDCCA et PBA) retrouvés dans l'urine des participants adultes et enfants des milieux urbain et rural. Le tableau 4 présente l'estimateur de tendance centrale Tukey pour les quantités de biomarqueurs dans les différents échantillons de population (milieu urbain et rural; adultes et enfants séparés ou combinés) ainsi que les degrés de signification (p) des comparaisons Mann-Whitney des niveaux de biomarqueurs entre le milieu urbain et rural. Les estimateurs de tendance centrale Tukey étaient systématiquement

plus élevés en milieu rural suggérant que les individus de la population rurale excrétaient plus de métabolites par période de temps et unité de poids corporel (pmol/12 h/kg pc); le seuil de signification ($p < 0,05$) n'a pas par contre pas été atteint dans toutes les conditions de comparaisons.

Tableau 3. Distribution des quantités de métabolites excrétées dans l'urine (pmol/12 h/kg pc) pour les différents échantillons de la population

Échantillon	Fréquence de détection % \geq LD ^a	Quantités excrétées de métabolites (pmol/12h/kg pc)		
		Médiane	5 ^e - 95 ^e centiles	Moyenne géométrique
tDCCA				
<u>Adultes</u>				
milieu urbain	100	12,0	3,71 - 231	15,4
milieu rural	95	16,4	4,87 - 133	19,8
<u>Enfants</u>				
milieu urbain	98	12,7	4,20 - 213,9	18,0
milieu rural	100	19,6	4,40 - 213	23,8
cDCCA				
<u>Adultes</u>				
milieu urbain	95	5,23	1,36 - 121	6,64
milieu rural	95	6,72	1,93 - 57,9	7,61
<u>Enfants</u>				
milieu urbain	96	5,33	1,47 - 62,6	6,18
milieu rural	95	6,44	1,19 - 45,1	7,39
PBA				
<u>Adultes</u>				
milieu urbain	96	8,91	1,94 - 193	11,4
milieu rural	96	13,8	3,76 - 144	15,4
<u>Enfants</u>				
milieu urbain	94	10,7	2,83 - 76,2	13,1
milieu rural	91	21,2	4,03 - 155	21,5

^aLD = Limite de détection analytique des métabolites soit : tDCCA : 0,01 μ g/L; cDCCA : 0,007 μ g/L; PBA : 0,01 μ g/L.

Tableau 4. Comparaison des niveaux de métabolites de pyréthriinoïdes entre les échantillons ruraux et urbains

Comparaison urbain-rurale (Mann-Whitney) avec	Métabolite		
	tDCCA	cDCCA	PBA
Tous les groupes d'âge			
Estimateur Tukey ^a urbain (pmol/kg pc/12h)	11,1	4,41	8,28
Estimateur Tukey ^a rural (pmol/kg pc/12h)	14,3	5,10	11,6
Valeur de p	0,053	0,158	0,020 ^b
Les adultes seulement			
Estimateur Tukey ^a urbain (pmol/kg pc/12h)	10,1	3,99	6,88
Estimateur Tukey ^a rural (pmol/kg pc/12h)	13,5	5,11	10,6
Valeur de p	0,207	0,285	0,052
Les adultes sans exposition professionnelle seulement			
Estimateur Tukey ^a urbain (pmol/kg pc/12h)	10,1	3,99	6,88
Estimateur Tukey ^a rural (pmol/kg pc/12h)	14,2	5,52	11,2
Valeur de p	0,137	0,153	0,042 ^b
Les enfants seulement			
Estimateur Tukey ^a urbain (pmol/kg pc/12h)	12,0	4,68	9,07
Estimateur Tukey ^a rural (pmol/kg pc/12h)	16,9	5,02	16,1
Valeur de p	0,052	0,368	0,082

^a L'estimateur Tukey Biweight est une mesure de tendance centrale robuste qui est moins sensible à la normalité de la distribution.

^b Indique qu'il y a une différence statistiquement significative ($p < 0,05$) entre le groupe urbain et rural pour ce métabolite.

3.4 Facteurs documentés par questionnaire

La comparaison des facteurs d'exposition ou de modification potentiels (voir tableau 1) selon le milieu de résidence suggère que les adultes à l'étude demeurant en milieu urbain utilisaient moins de pesticides domestiques à l'intérieur ($p = 0,013$) et moins de chasse-moustiques ($p = 0,005$) que les adultes demeurant en milieu rural sans exposition professionnelle. D'autres facteurs pour lesquels une différence significative a été observée entre les adultes du milieu rural et urbain sont le genre (plus de femmes dans le groupe urbain ($p = 0,048$)), l'âge (groupe rural plus âgé ($p = 0,005$)), le poids (groupe rural plus lourd ($p < 0,001$)) et l'indice de masse corporelle (plus élevé en milieu rural ($p < 0,001$)).

Chez les enfants, les facteurs pour lesquels une différence statistiquement significative a été observée selon le milieu de résidence sont la visite de lieux potentiellement contaminés (plus fréquente dans le groupe demeurant en milieu rural ($p = 0,004$)), l'utilisation de pesticides à l'extérieur de la maison (plus fréquente dans le groupe rural ($p < 0,001$)), l'âge (groupe urbain plus âgé ($p = 0,017$)) et le poids (groupe urbain plus lourd ($p = 0,044$)).

4. Discussion

Dans la présente étude, un ensemble de biomarqueurs urinaires a été utilisé comme indice de l'exposition aux pyréthrine et aux pyréthrinoïdes dans la population générale adulte et infantile résidant en milieu urbain et rural. Cette étude a la particularité de comparer des quantités de métabolites excrétées par période de temps et de contrôler pour le poids corporel. Il a été démontré que cette unité d'expression des résultats est moins influencée par les variations naturelles du volume urinaire et permet d'éviter l'ajustement par la créatinine [3].

Pour les métabolites comme le tDCCA, cDCCA et PBA dont la fréquence de détection permettait des analyses comparatives et qui proviennent des pyréthrinoïdes dont l'usage est le plus répandu (perméthrine et cyperméthrine), l'excrétion tendait à être plus élevée en milieu rural qu'en milieu urbain. Toutefois, la différence n'était significative que pour le PBA. Ce dernier est un métabolite de nombreux pyréthrinoïdes (voir tableau 2) qui servent notamment en agriculture (dans les champs, vergers et serres) et dans les bâtiments pour animaux, les lieux d'entreposage de nourriture et en extermination (I. Gorse, MDDEP, communication personnelle). Au Québec, les précurseurs du tDCCA et du cDCCA sont

utilisés sur les animaux d'élevage, dans les usines de transformation et de production alimentaire et sur de nombreuses cultures [7].

Par ailleurs, parmi les métabolites de pyréthriinoïdes et pyréthrines dont le pourcentage de détection ne permettait pas des analyses comparatives (FPBA, DBCA et CDCA), la comparaison de la fréquence de détection d'un milieu à un autre n'a montré qu'une différence significative robuste que pour le FPBA. Une différence significative est estimée robuste si elle est présente dans les trois conditions de comparaisons c'est-à-dire, chez les enfants, chez les adultes et chez les adultes et les enfants combinés. Le FPBA était au-delà seuil de détection chez environ 52% et 34% des enfants et adultes vivant en milieu rural alors qu'en milieu urbain, il n'était détectable que dans 16% et 8% des échantillons urinaires provenant d'enfants et d'adultes, respectivement. Le FPBA est un métabolite semi-spécifique qui est un indice de l'exposition à la cyfluthrine ou à la fluméthrine. Considérant que la fluméthrine n'est pas homologuée au Canada, la cyfluthrine est probablement à l'origine de cette différence. Le CDCA, un métabolite de nombreux pyréthriinoïdes et des pyréthrines, était aussi excrété en plus grande quantité chez les adultes demeurant en milieu rural mais ce n'était pas le cas pour les enfants ou lorsque les adultes et enfants étaient considérés ensemble.

Au Québec, la cyfluthrine est utilisée en extermination et dans des étiquettes d'oreilles pour les bovins (I. Gorse, Ministère du développement durable, de l'environnement et des parcs (MDDEP), communication personnelle). L'usage en extermination peut avoir lieu tant en milieu rural qu'urbain et représente la plupart des ventes de cyfluthrine. Un agriculteur ayant un permis d'entreprise (agricole) peut d'ailleurs s'en procurer pour traiter ses bâtiments de ferme. Ce produit doit normalement être utilisé pour traiter « par endroit »

sauf dans les bâtiments d'élevage où il peut être vaporisé sur de grandes surfaces (I. Gorse, MDDEP, communication personnelle). Les étiquettes d'oreilles ne peuvent évidemment que se retrouver en milieu rural mais ce type de formulation est peu propice à la contamination humaine, sauf pour le travailleur pendant la période d'installation si des gants ne sont pas portés. De l'échantillonnage environnemental serait souhaitable afin de déterminer la voie de contamination la plus probable chez les individus demeurant en milieu rural.

À la lumière de l'analyse des facteurs d'exposition potentiels et personnels documentés par questionnaire, les adultes de la population générale vivant en milieu rural semblaient utiliser plus de pesticides domestiques et de chasse-moustiques; ces produits peuvent contenir des précurseurs des DCCA, du PBA et du CDCA. Les autres facteurs qui différaient entre le groupe urbain et rural, c'est-à-dire les caractéristiques personnelles (poids, IMC), ne devraient pas avoir d'effet sur la comparaison puisque l'unité utilisée pour effectuer la comparaison était corrigée pour le poids corporel. Quant à l'âge, nous n'avons pas de raison de croire que celui-ci aurait une influence sur l'exposition aux pyréthriinoïdes.

Toujours selon les questionnaires, l'usage de pesticides à l'extérieur était plus fréquent autour des résidences d'enfants demeurant en milieu rural et les enfants du milieu rural auraient aussi davantage visité des lieux potentiellement contaminés. La différence de poids corporel observée entre les enfants demeurant en milieu rural et ceux habitant en milieu urbain est sans doute corrélée à la différence d'âge et ne devrait pas avoir d'effet puisque l'unité employée pour faire les comparaisons était ajustée pour le poids corporel. Le port des mains à la bouche pourrait toutefois être plus fréquent chez les plus jeunes enfants et les enfants en milieu rural étaient en moyenne plus jeunes que ceux en milieu urbain.

En somme, la comparaison de ces études transversales indique que les individus de la population générale, tant en milieu urbain que rural, sont exposés de façon ubiquiste aux pyréthrinés et aux pyréthrinoïdes, notamment par l'alimentation. À ce niveau de base s'ajoutent, en milieu rural, d'autres sources contributives faisant en sorte que cet échantillon de la population présente des niveaux d'excrétion légèrement plus élevés.

Bien que l'utilisation de biomarqueurs permette d'observer cette relation, ces derniers ne permettent pas d'identifier précisément les sources d'exposition, i.e. si la zone de résidence a effectivement un impact ou s'il s'agit principalement de différences comportementales qui ne seraient alors que des variables intermédiaires. À cet effet, l'étude pourrait être reprise en période hivernale, alors qu'il n'y a pas d'utilisation de pesticides à l'extérieur à cause du gel et de la neige. Aussi, l'inclusion de mesures environnementales de l'exposition dans les résidences des participants des deux milieux permettrait de déterminer quelles sont les causes de ces différences et s'il est possible d'agir sur certaines d'entre elles afin de réduire l'exposition.

Remerciements

Les auteurs souhaitent exprimer leur gratitude à l'Institut national de santé publique du Québec (INSPQ) qui a financé les études de terrain en milieu rural et urbain, à Mme Caroline Couture et M. Claude Tremblay pour leur rôle dans la gestion du projet en Montérégie, à M. Pierre Dumas pour la réalisation des analyses biochimiques et à Mme Isabelle Gorse pour les précisions sur l'utilisation des pyréthrinoïdes et des pyréthrinés au Québec.

Références

1. Saieva C, Aprea C, Tumino R, Masala G, Salvini S, Frasca G, *et al.* Twenty-four-hour urinary excretion of ten pesticide metabolites in healthy adults in two different areas of Italy (Florence and Ragusa). *Sci Total Environ.* 2004; 332: 71-80.
2. Becker K, Seiwert M, Angerer J, Kolossa-Gehring M, Hoppe HW, Ball M, *et al.* GerES IV pilot study: assessment of the exposure of German children to organophosphorus and pyrethroid pesticides. *Int J Hyg Environ Health.* 2006; 209: 221-33.
3. Fortin MC, Carrier G, Bouchard M. Concentrations versus amounts of biomarkers in urine: a comparison of approaches to assess pyrethroid exposure. *Environ Health.* 2008; 7: 55.
4. Fortin MC, Bouchard M, Carrier G, Dumas P. Biological monitoring of exposure to pyrethrins and pyrethroids in a metropolitan population of the Province of Quebec, Canada. *Environ Res.* 2008; 107: 343-50.
5. Couture C. Caractérisation de l'exposition aux pyréthrinoïdes dans la population rurale agricole de la Montérégie. Montreal: Université de Montreal; 2008.
6. Leng G, Gries W. Simultaneous determination of pyrethroid and pyrethrin metabolites in human urine by gas chromatography-high resolution mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005; 814: 285-94.
7. Ministère de l'environnement et direction de la toxicologie humaine (INSPQ), editor. Répertoire des principaux pesticides utilisés au Québec. Sainte-Foy: Publications du Québec; 2002.

Contribution des auteurs

Marie-Chantale Fortin : a conçu et réalisé les analyses, interprété les résultats et rédigé la version originale.

Michèle Bouchard : a contribué à la conception de l'étude et à l'interprétation des résultats et révisé le manuscrit original.

Gaétan Carrier : a contribué à la conception de l'étude, à l'interprétation des résultats et à la révision du manuscrit original.

Concentrations versus amounts of biomarkers in urine: a comparison of approaches to assess pyrethroid exposure⁴

Marie-Chantale Fortin, Gaétan Carrier, Michèle Bouchard*

Department of Environmental and Occupational Health, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Main Station, Montreal, Quebec, H3C 3J7, CANADA

*Corresponding author

⁴ Article publié dans Environmental Health. 2008, 7(1) : 55 (Epub)

Abstract

Background

Assessment of human exposure to non-persistent pesticides such as pyrethroids is often based on urinary biomarker measurements. Urinary metabolite levels of these pesticides are usually reported in volume-weighted concentrations or creatinine-adjusted concentrations measured in spot urine samples. It is known that these units are subject to intra- and inter-individual variations. This research aimed at studying the impact of these variations on the assessment of pyrethroid absorbed doses at individual and population levels.

Methods

Using data obtained from various adult and infantile populations, the intra and inter-individual variability in the urinary flow rate and creatinine excretion rate was first estimated. Individual absorbed doses were then calculated using volume-weighted or creatinine-adjusted concentrations according to published approaches and compared to those estimated from the amounts of biomarkers excreted in 15- or 24-h urine collections, the latter serving as a benchmark unit. The effect of the units of measurements (volume-weighted or creatinine adjusted concentrations or 24-h amounts) on results of the comparison of pyrethroid biomarker levels between two populations was also evaluated.

Results

Estimation of daily absorbed doses of permethrin from volume-weighted or creatinine-adjusted concentrations of biomarkers was found to potentially lead to substantial under or overestimation when compared to doses reconstructed directly from amounts excreted in urine during a given period of time (−70 to +573% and −83 to +167%, respectively). It was

also shown that the variability in creatinine excretion rate and urinary flow rate may introduce a bias in the case of between population comparisons.

Conclusions

The unit chosen to express biomonitoring data may influence the validity of estimated individual absorbed dose as well as the outcome of between population comparisons.

Background

The assessment of human exposure to environmental contaminants such as chemical pesticides is often based on the measurement of metabolites excreted in urine. In such studies, participants are asked to provide either a spot sample, multiple spot samples or pooled voids over timed collection periods (ex: 24 h). Biomarker results can therefore be expressed in terms of volume-weighted concentrations ($\mu\text{g/L}$ or nmol/L , for example), creatinine-adjusted concentrations ($\mu\text{g/g}$ of creatinine or $\mu\text{mol/mol}$ of creatinine), cumulative amounts of metabolite excreted over specified periods of time, usually 24 h ($\mu\text{g/day}$ or nmol/day), or hourly excretion rates (ng/h or pmol/h). All those units can be corrected for the body weight of the participants.

In the specific case of non-persistent pesticides, namely pyrethroids and organophosphates (OPs), the determination of amounts of a biomarker in 24-h urine collections is generally considered the “benchmark” unit of expression of biomonitoring results [1-3]. Some authors have successfully measured cumulative daily amounts or hourly excretion rates of pyrethroids (μg or nmol/day or ng or pmol/h) [4-8] and a few others are available in the case of OP pesticides [6, 9-11]. However, it is often deemed difficult to achieve in some

cases due the risk of incomplete samples, insufficient adherence to the protocol and potential attrition among the participants.

Therefore, urinary metabolite levels of these pesticides are usually reported in volume-weighted concentrations ($\mu\text{g/L}$ or nmol/L ; [12-20]) and/or creatinine-adjusted concentrations ($\mu\text{g/g}$ of creatinine; [15, 21-24]). Such units are generally used when participants provide one or more spot samples. However, the use of spot urine samples has been questioned in the case of some non-persistent pesticides [25, 26].

Volume-weighted concentrations are influenced by urine dilution, which has been documented to be subject to important intra- and inter-individual variations due to the variability in intrinsic and extrinsic factors: liquid intake, perspiration, humidity level, circadian changes, glomerular filtration rate, age, disease (e.g., diabetes, lupus), menstrual cycle, etc. [27-30]. To account for the variations in urine volume, numerous researchers rely on creatinine standardization although creatinine levels have also been reported to be subject to intra- and inter-individual variations linked to: physical activity, circadian changes, age, gender, ethnicity, body size, lean-body mass and protein intake [29, 31-36].

Creatinine-adjusted concentrations or volume-weighted concentrations of pesticide metabolites have been used to estimate the absorbed daily dose in individuals [37-40]. Creatinine-adjusted concentrations are thus extrapolated to 24-h excretions using age- and gender-specific default daily creatinine excretion values taken from the biomedical literature or using calculated values which also consider height and weight. As for volume-weighted concentrations, they are converted to 24-h excretions using age- and gender-specific default daily urine volumes.

Pyrethroids are compounds with relatively short half-lives and a large fraction, as much as 78%, of an oral dose in volunteers is excreted as metabolites in urine within 24 hours post-exposure [41]. Therefore, the time of sampling could influence the outcome of the extrapolation to 24 h, as in the case of OP pesticides for which it has been reported that a first morning void should be preferred if only a spot sample is collected [42]. The influence of the toxicokinetics of non-persistent pesticides on the choice of a sampling time frame was more thoroughly discussed in Barr et al. [26]. However, the influence of the variability in creatinine excretion rate and urinary flow rate on estimated absorbed doses reconstructed from creatinine-adjusted concentrations or volume-weighted concentrations has not been systematically assessed in the case of the non-persistent pyrethroid pesticides.

At the population level, the variability in creatinine excretion rate may also influence results of comparisons of creatinine-adjusted concentrations of biomarkers between studies while the variability in the urinary flow rate may affect volume-weighted concentrations. This variability may have an impact on results of comparisons of biomonitoring data between populations, under different units of measurements, but this has yet to be verified.

The purpose of this study was to determine the relative impact of the different units of expression of pyrethroid biomarker data (volume-weighted concentrations, creatinine-adjusted concentrations and amounts of metabolite excreted) i) on estimates of reconstructed absorbed doses and ii) on results of comparisons of biomonitoring data between studies while further documenting intra- and inter-individual variability in creatinine excretion rate and urinary flow rate.

Methods

Study groups and sample collection

For the determination of the impact of units of expression of biomarker data on exposure assessment, data from three pesticide biomonitoring studies were used. Only the participants who achieved a full collection during the required period (i.e. did not report urine losses of more than a few drops) were considered for the present analysis. All studies were approved by the Human Research Ethics Committee of the Faculty of Medicine of the Université de Montréal. Adult participants gave their informed consent and children gave their assent in addition to the parents consent.

Study 1 consisted in the biomonitoring of OP exposure in a group of horticultural greenhouse workers with low physical workload (n = 15) [9, 43]. The workers collected all their urine during a 24-h period; they provided each void in a separate bottle and recorded the time of each micturition. Characteristics of the participants are shown in Table 1.

Table 1 – Characteristics of the subjects in study 1

Subject	Gender	Weight (kg)
Subject 1	Male	75
Subject 2	Male	64
Subject 3	Female	57
Subject 4	Female	48
Subject 5	Female	43
Subject 6	Female	55
Subject 7	Female	50
Subject 8	Male	77
Subject 9	Female	64
Subject10	Female	56
Subject 11	Female	50
Subject 12	Female	68
Subject 13	Male	73
Subject 14	Female	55
Subject 15	Female	57

Study 2 was conducted in the adult and infantile general population of a large urban and suburban area, the Montreal Island, Quebec, Canada [4]. Adults (n = 74) collected all their urine during a period of 24 h, in two separate bottles. The first bottle contained the urines voided between 6 pm until the next morning including first urine void on rising. In the second bottle, all the urines voided following the first morning void until 6 pm were cumulated. Children (n = 74) only carried out the overnight collection from 6 pm until the next morning including first morning void (equivalent to the first bottle in adults).

Study 3 was conducted in the adult and infantile general population of the large rural and agricultural area of the Montérégie, Quebec, Canada [5]. Adults (n = 109) and children (n = 42) collected in one bottle all their urine voided overnight from 6 pm until the next morning including first void upon waking. Characteristics of the participants of studies 2 and 3 are depicted in Table 2.

In both studies 2 and 3, subjects were asked to carefully note the exact time of urine collection (first and last urine in each bottle) and the time of the last urination prior to the onset of urine collection. This allows the precise determination of the accumulation time in the bladder and, hence, the determination of the urinary flow rate, creatinine excretion rate and metabolite excretion rates.

Table 2 – Characteristics of the subjects in studies 2 and 3

Variable	Study 2 (Urban)		Study 3 (Rural)	
	Adults	Children	Adults	Children
N	74	74	109	42
Gender				
n (%) female	51 (69)	37 (50)	57 (52)	20 (48)
Age (years)				
Range	22-63	6-12	18-70	5-12
Median	41	9	48	8
5 th , 95 th percentiles	26-60	7-12	26-64	6-12
Weight (kg)				
Range	38-103	18-61	50-127	15-73
Median	66	32	73	27
5 th , 95 th percentiles	47-92	22-54	53-106	20-51
Height (m)				
Range	1.50-1.93	1.04-1.73	1.47-1.93	1.00-1.73
Median	1.66	1.40	1.68	1.32
5 th , 95 th percentiles	1.55-1.82	1.15-1.57	1.53-1.84	1.12-1.63

Urine analysis

Samples were analyzed at the *Laboratoire de Toxicologie Humaine* of the *Institut national de santé publique du Québec*. This public laboratory takes part in an international inter-laboratory testing program for quality assurance.

Among the different parameters measured and of interest in the current work, in study 1, it included the measurement of total urine volume and of creatinine contents. In studies 2 and 3, it included total urine volume and creatinine contents as well as the following pyrethroid metabolites: 3-phenoxybenzoic acid (PBA), cis-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylic acid (cDCCA) and trans-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylic acid (tDCCA). The creatinine concentration was assessed with a DRI creatinine kit from Diagnostix Ltd (Mississauga, Canada). The other analytical methods followed are described in details elsewhere [4, 5, 9, 43].

Data analysis

Assessment of the variability in the urinary flow rate and creatinine excretion rate

Metabolite concentrations ($\mu\text{g/L}$) depend on urine dilution and creatinine-adjusted metabolite concentrations ($\mu\text{g/g}$ of creatinine) depend on creatinine excretion rate. To assess urine dilution, the urinary flow rate, which corresponds to the volume of urine excreted on average per unit of time (mL/h), was calculated. To evaluate creatinine excretion, the average creatinine excretion rate ($\mu\text{g/h}$) was computed rather than creatinine concentration because the latter is influenced by urine dilution. The urinary flow rate and creatinine excretion rate were determined for each micturition in the case of the participants of study 1 and for each collection period in the case of the participants of studies 2 and 3.

From study 1, the void-to-void intra-individual variability in the urinary flow rate and creatinine excretion rate was assessed over a 24-h period. For each subject, the following descriptive statistics were computed in Microsoft Excel (Office 2000, Microsoft corp.): the mean (\bar{x}), the minimum (MIN) and maximum (MAX) rates, the maximum to minimum rate ratio (MAX/MIN), and the coefficient of variation in rate values (expressed as a percentage (%CV)).

From studies 2 and 3, the inter-individual variability in the hourly urinary flow rate and creatinine excretion rate (established on the basis of nighttime collections) was evaluated within each study and in both studies combined. In all cases, adults and children were analyzed separately. Descriptive statistics were computed in Excel (\bar{x} , MIN, 5th and 95th percentiles, MAX, MAX/MIN and %CV). Distributions of the 12-h volumes and 12-h

creatinine excretion were also established for the adult and infantile urban and rural populations.

Effect of the variability in the urinary flow rate and creatinine excretion rate on individual exposure assessment

Once the variability in the urinary flow rate and creatinine excretion rate was determined in the studied population samples, its influence on estimates of reconstructed absorbed doses from volume-weighted concentrations or creatinine-adjusted concentrations was assessed. More specifically, estimates of absorbed doses reconstructed from biomarker concentrations were calculated for each individual within each of the studied populations (adult and children separately and studies 2 and 3 also separately). Those concentration-based dose estimates were compared to doses individually reconstructed from cumulative amounts of pyrethroid metabolites in nighttime urine collections, which was considered as the “standard” approach.

Estimation of daily absorbed dose from cumulative amounts of metabolite found in nighttime collections

For dose reconstruction, molar amounts of metabolites excreted during the nighttime collection period (more or less 15 h) were extrapolated to 24 hours by calculating the hourly excretion rate (MHER, equation 1) and by multiplying its value by 24 and by the molecular weight of permethrin (MW_p) ((DDCA) equation 2). The fraction of absorbed dose recovered in urine as the studied metabolite was not considered for the purpose of comparing concentration-based dose estimates with doses reconstructed from cumulative amounts but this does not have any impact on the results of comparisons.

The validity of extrapolating nighttime excretions to 24-h excretions was verified by comparing the hourly excretion rate calculated on the basis of the nighttime collections to the hourly excretion rate of metabolites established on the basis of 24-h collections in one of the studied population samples (adults of study 1). The comparisons were performed using the non-parametric Wilcoxon test for related samples and the Spearman correlation test.

Estimation of daily absorbed dose from metabolite volume-weighted concentrations in nighttime collections

For dose reconstruction from volume-weighted concentrations ($DDVWC_p$), the approach published by Fenske et al. [37] was followed (equation 3). Daily exposure to permethrin was determined from the volume-weighted concentrations ($\mu\text{g/L}$) by multiplying it by age- and gender-specific estimates of daily urinary volumes taken from the medical literature [44]. This daily exposure was calculated for the individuals of each studied population.

Estimation of daily absorbed dose from metabolite creatinine-adjusted concentrations in nighttime collections

For dose reconstruction from creatinine-adjusted concentrations ($DDCAC_p$), the approaches published by Fenske et al. [37] and by Mage et al. [39] were followed (equation 4). Using the method of Fenske et al., daily exposure to permethrin was estimated by multiplying creatinine-adjusted concentrations ($\mu\text{g/g}$ of creatinine) by daily creatinine excretions values taken from the medical literature [45]. Using the method of Mage et al., daily exposure to permethrin was estimated by multiplying creatinine-adjusted concentrations ($\mu\text{g/g}$ of creatinine) by daily amounts of creatinine in urine calculated on the

basis of formulas that account for gender, age, height and weight differences between participants.

$$(1) \text{ MHER} = ([\text{DCCA}] \times \text{volume}) / \text{duration}$$

$$(2) \text{ DDCA}_p = \text{MHER} \times 24 \text{ h} \times \text{MW}_p$$

$$(3) \text{ DDVWC}_p = [\text{DCCA}] \times \text{DUV} \times \text{MW}_p$$

$$(4) \text{ DDCAC}_p = [\text{DCCA}]_{\text{cr}} \times \text{DCE} \div \text{MW}_{\text{DCCA}} \times \text{MW}_p$$

Where: MHER = Metabolite excretion rate

DDCA_p = Daily dose of permethrin calculated from cumulative amounts of metabolite in urine ($\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/day)

DDVWC_p = Daily dose of permethrin calculated from volume-weighted concentration of metabolite in urine ($\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/day)

DDCAC_p = Daily dose of permethrin calculated from creatinine-adjusted concentration of metabolite in urine ($\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/day)

$[\text{DCCA}]$ = sum of molar concentrations (nmol/L) of the cDCCA and tDCCA (*cis/trans*) conformational isomers

$[\text{DCCA}]_{\text{cr}}$ = sum of creatinine-adjusted concentration ($\mu\text{g}/\text{g}$ of creatinine) of cDCCA + tDCCA

volume = total urine volume over the collection period (L)

duration = time elapse between the last void prior to onset of collection and the last void collected in the bottle (h)

MW_p = Molecular weight of permethrin. Permethrin was chosen since it appears as one of the main pyrethroids to which the general population is chronically exposed [4] (I. Gorse, personal communication).

MW_{DCCA} = Molecular weight of DCCA

DUV = Daily urinary volume (L) taken from the medical literature [44]

DCE = Daily creatinine excretion (g) taken from the medical literature [45] or predicted from formulas [39]

Effect of variability in the urinary flow rate and creatinine excretion rate on the comparison in biomarker values between two populations

The effect of the inter-individual variability in the urinary flow rate or creatinine excretion rate on results of the comparison between two populations of biomarker data expressed in different units was also assessed. The pyrethroid metabolite levels between the urban and rural populations (studies 2 and 3) were compared on the basis of either volume-weighted concentrations, creatinine-adjusted concentration or, as a reference, excretion rates of pyrethroid metabolites adjusted for the body weight. A pre-analysis Kolmogorov-Smirnov normality test indicated that a non-parametric approach should be preferred because the volume-weighted concentrations, creatinine-adjusted concentrations and excretion rates of pyrethroid metabolites were not normally distributed. Comparison of the biomarker data between the urban and rural populations (adults and children separately) was thus performed using the non-parametric Mann-Whitney U test. Since the purpose of these comparisons was to assess the impact of the units of expression of biomarker data on results, samples below the detection limit were excluded. Differences in urinary flow rates and creatinine excretion rates between the urban and rural populations were also assessed using the Student t-test and Mann-Whitney U test, when the data was normally or not-normally distributed, respectively.

Results

Variability in the urinary flow rate and creatinine excretion rate

Intra-individual variability in urinary flow rate and creatinine excretion rate

Table 3 presents the intra-individual variability in the hourly urinary flow rate and creatinine excretion rate over a 24-h period, as assessed in the 15 subjects of study 1. Depending on the participant, the max/min ratio in the urinary flow rate (hence urine dilution) during a 24-h period varied between 2.5 and \approx 18-fold. This corresponds to a coefficient of variation of 36.1 to 101%. Creatinine excretion rate was found to be less variable than the urinary flow rate. For a given individual, a 1.1 to 6.6-fold variation (max/min) in the creatinine excretion rate was observed over a 24-h period. This translates into a coefficient of variation of up to \approx 48%.

Table 3 - Intra-individual variability in hourly urinary flow rate and creatinine excretion rate over a 24-h period

	Urinary flow rate					Creatinine excretion rate				
	Mean (mL/h)	Min (mL/h)	Max (mL/h)	$\frac{\text{Max}}{\text{Min}}$	CV ^a %	Mean (g/h)	Min (g/h)	Max (g/h)	$\frac{\text{Max}}{\text{Min}}$	CV ^a %
Subject 1	66.9	38.4	96.5	2.5	36.1	0.074	0.043	0.10	2.4	32.9
Subject 2	67.7	38.4	107	2.8	48.2	0.061	0.055	0.069	1.3	9.66
Subject 3	120	24.9	437	18	101	0.044	0.031	0.051	1.7	13.7
Subject 4	119	57.6	176	3.1	42.3	0.038	0.030	0.047	1.6	14.5
Subject 5	68.8	23.2	123	5.3	57.0	0.027	0.012	0.038	3.2	32.0
Subject 6	46.2	24.7	62.4	2.5	42.0	0.035	0.028	0.044	1.6	24.0
Subject 7	91.0	22.9	185	8.1	77.7	0.034	0.026	0.040	1.5	14.3
Subject 8	53.9	26.9	107	4.0	68.5	0.069	0.065	0.074	1.1	6.06
Subject 9	38.0	20.3	57.3	2.8	40.0	0.052	0.049	0.055	1.1	6.00
Subject 10	70.9	25.1	99.0	3.9	42.8	0.037	0.032	0.045	1.4	15.4
Subject 11	49.0	24.0	67.6	2.8	38.8	0.037	0.022	0.047	2.1	31.0
Subject 12	97.9	21.3	168	7.9	58.9	0.033	0.015	0.044	2.9	34.0
Subject 13	50.3	28.3	84.9	3.0	45.7	0.065	0.034	0.082	2.4	27.6
Subject 14	93.4	53.5	167	3.1	54.2	0.055	0.049	0.077	1.6	17.9
Subject 15	98.4	14.6	188	13	59.7	0.037	0.010	0.063	6.6	48.4

^aCV = coefficient of variation (standard deviation/mean x 100%)

Inter-individual variability in urinary flow rate and creatinine excretion rate

Table 4 shows the inter-individual variability in the hourly urinary flow rate and creatinine excretion rate (calculated on the basis of an overnight collection from 6 pm until the next morning, including the first void on rising), as assessed for the infantile and adult urban population (study 2), rural population (study 3) and both populations pooled together (studies 2 and 3). In adults, there was up to an 18-fold inter-individual variation (max/min) in the hourly urinary flow rate, as compared to a 6.5-fold variation in children.

On the other hand, in adults, the highest creatinine excretion rate was 9.2 times higher than the smallest rate and in children there was a 12-fold inter-individual variation in the creatinine excretion rate, expressed in grams per hour.

The corresponding variability in total volume and creatinine contents in adults and children over a normalized 12-h collection period is also depicted in Figure 1. The distributions observed in the urban and rural population were quite similar, except in the case of creatinine excretion in adults (Figure 1b) where the distribution in the rural population was displaced to the right compared to the urban population (Mann-Whitney $p < 0.001$).

Table 4 - Inter-individual variability in hourly urinary flow and creatinine excretion rates calculated from nocturnal urine collections

	Urinary flow rate					Creatinine excretion rate				
	Mean	Range	Percentiles	Max	CV ^a	Mean	Range	Percentiles	Max	CV ^a
	(mL/h)	(Min-Max) (mL/h)	(5-95 th) (mL/h)	Min	%	(mL/h)	(Min-Max) (mL/h)	(5-95 th) (mL/h)	Min	%
Adults										
Urban (n=74)	59.8	7.21-133	21.8-113	18	47.1	0.049	0.016-0.10	0.019-0.084	6.7	36.4
Rural (n=109)	63.4	20.6-127	29.7-108	6.2	38.7	0.062	0.020-0.14	0.034-0.10	7.1	35.6
Both (n=183)	62.0	7.21-133	26.4-112	18	42.1	0.057	0.016-0.14	0.029-0.095	9.2	37.4
Children										
Urban (n=74)	32.0	10.7-69.5	13.4-61.9	6.5	48.0	0.027	0.011-0.082	0.014-0.045	7.7	42.1
Rural (n=42)	26.6	10.8-64.6	14.3-48.7	6.0	45.9	0.025	0.0071-0.065	0.013-0.042	9.1	44.6
Both (n=116)	30.1	10.7-69.5	13.6-61.4	6.5	48.2	0.026	0.0071-0.082	0.014-0.045	12	43.1

^aCV = coefficient of variation (standard deviation/mean x 100%)

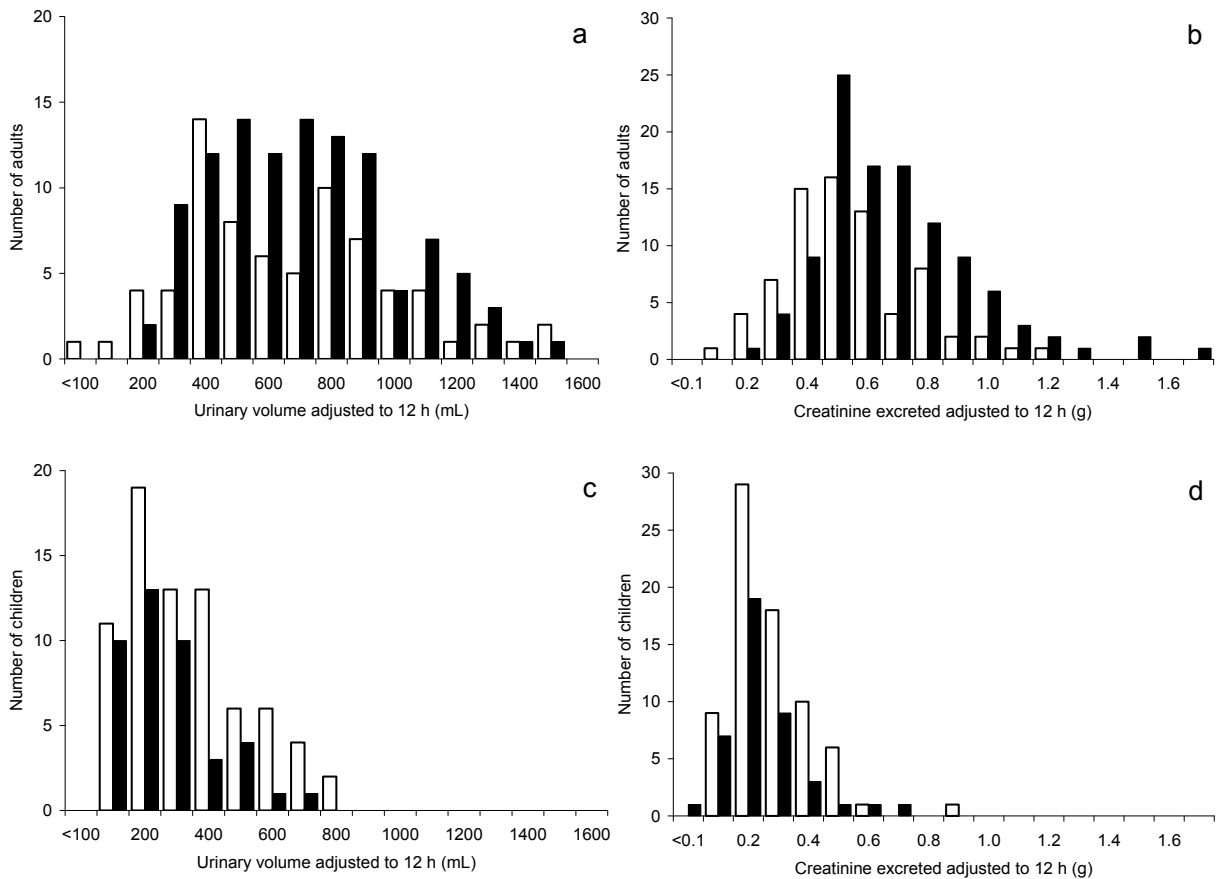


Figure 1 - Urine volumes (mL/12 h) and creatinine amounts (g/12h) in adults and children from urban (□) and rural (■) populations.

Effect of inter-individual variability in the urinary flow rate and creatinine excretion rate on individual exposure assessment

The impact of the units of expression of urinary biomarker measurements used to estimate individual absorbed daily dose of a pyrethroid was assessed in adults and children of urban and rural populations. It was first determined that daily urinary amounts of pyrethroid metabolites could be inferred from amounts in nighttime collections. The hourly excretion rate of DCCA and PBA in urines collected from 6 pm until the next morning including the first morning void was not significantly different from urinary metabolite hourly excretion rates calculated on the basis of 24-h urine collections (Wilcoxon p values = 0.177 for DCCA and 0.381 for PBA). A good correlation was also observed between the two variables (Spearman rho = 0.925 for DCCA and 0.934 for PBA (p values < 0.001)).

The estimated absorbed daily dose of permethrin reconstructed from volume-weighted concentrations (as proposed by Fenske et al. [37]) (Table 5) or creatinine-adjusted concentrations (as proposed by Fenske et al. [37] and Mage et al. [39]) (Tables 6 and 7) was then compared to the permethrin daily absorbed dose obtained directly from cumulative molar amounts of metabolites in overnight urine collections. In those tables, the data presented correspond to the estimates for the individuals with urinary flow rates and creatinine excretion rates equal or closest to the minimum, 5th percentile, median, 95th percentile and maximum of their respective population sample. The absorbed doses of permethrin estimated from volume-weighted concentrations of DCCA in the adults or children from the urban or rural area with a median urinary flow rate differed by 0 to 46% from the values calculated directly from cumulative amounts of biomarker in urine (Table 5). However, for the individuals with the lowest urinary output rate, doses reconstructed from volume-weighted concentrations of DCCA overestimated by 96 to 573%, hence by

≈2.0 to 6.7 times, the doses calculated from cumulative urinary amounts of biomarker. For the participants with the highest urinary flow rate, doses reconstructed from concentrations underestimated by 39 to 70%, hence by about 0.3 to 0.6 times, the values obtained from cumulative amounts. Correspondingly, when considering the 5 and 95th percentile of urinary flow rates instead of the minimum and maximum values, an overestimation of 160% and an underestimation of 55% were calculated.

Table 5 - Absorbed permethrin dose estimated from volume-weighted concentrations (V) and amounts (A) of DCCA

		Permethrin absorbed dose		
		(A) Estimated from cumulative amounts (µg/kg bw/day)	(V) Estimated from volume-weighted concentrations ^a (µg/kg bw/day)	V/A
Adults				
Urban	Lowest ^b	0.00354	0.0238	6.7
	5th percentile ^c	0.0564	0.134	2.4
	Median ^d	0.00941	0.0137	1.5
	95th percentile ^e	0.00571	0.00390	0.68
	Highest ^f	0.0304	0.0111	0.37
Rural	Lowest ^b	0.00143	0.00337	2.4
	5th percentile ^c	0.0113	0.0295	2.6
	Median ^d	0.00573	0.00725	1.3
	95th percentile ^e	0.00241	0.00108	0.45
	Highest ^f	0.0203	0.0123	0.61
Children				
Urban	Lowest ^b	0.0185	0.0365	2.0
	5th percentile ^c	0.00551	0.00833	1.5
	Median ^d	0.00537	0.00621	1.2
	95th percentile ^e	0.0310	0.0170	0.55
	Highest ^f	0.0258	0.00780	0.30
Rural	Lowest ^b	0.00481	0.00941	2.0
	5th percentile ^c	0.104	0.222	2.1
	Median ^d	0.00966	0.00970	1.0
	95th percentile ^e	0.0183	0.0115	0.63
	Highest ^f	0.0188	0.00980	0.52

^aCalculated according to the method of Fenske et al. [37]

^bAbsorbed dose estimates for the participant with the lowest urinary flow rate

^cAbsorbed dose estimates for the participant with the urinary flow rate closest to the 5th percentile value

^dAbsorbed dose estimates for the participants with the median urinary flow rate

^eAbsorbed dose estimates for the participant with the urinary flow rate closest to the 95th percentile value

^fAbsorbed dose estimates for the participant with the highest urinary flow rate

The absorbed doses of permethrin estimated from creatinine-adjusted concentrations (method of Fenske et al. [37]) of DCCA in adults and children of the urban or rural population with median creatinine excretion rates differed by -44% to +23% from the doses calculated directly from cumulative urinary amounts (Table 6). For the participants with creatinine excretion rates closest to the 5th and 95th percentiles of their population sample, the error ranged from -39% to +112%. For the participants with the lowest creatinine excretion rate, doses reconstructed from creatinine-adjusted concentrations overestimated by 94 to 167%, hence by 2 to 3 times, the doses calculated directly from cumulative urinary amounts of biomarker. For the individuals with the highest creatinine excretion rate, doses reconstructed from creatinine-adjusted concentrations underestimated by 32% to more than 83%, hence by 0.2 to 0.7 times, the values obtained from cumulative amounts. With a more refined approach published by Mage et al. [39] for dose reconstruction based on creatinine-adjusted concentrations that takes into account the height of the subjects in addition to their weight and age, the estimates of absorbed dose were slightly closer to the values calculated from cumulative amounts of biomarker (Table 7), ranging from -63% to +93% of the actual amounts in the case of adults and from -61% to +187% in the case of children.

Table 6 - Absorbed permethrin dose estimated from creatinine-adjusted concentrations (C1) and amounts (A) of DCCA

		Relative creatinine excretion rate	Permethrin absorbed dose		
			(A) Estimated from cumulative amounts (µg/kg bw/day)	(C1) Estimated from creatinine-adjusted concentrations ^a (µg/kg bw/day)	C1/A
Adults					
Urban	Lowest ^b		0.00625	0.0167	2.7
	5th percentile ^c		0.00749	0.0159	2.1
	Median ^d		0.835	0.739	0.89
	95th percentile ^e		0.0153	0.0131	0.86
	Highest ^f		0.00912	0.00622	0.68
Rural	Lowest ^b		0.0164	0.0340	2.1
	5th percentile ^c		0.0136	0.0167	1.2
	Median ^d		0.0155	0.0191	1.2
	95th percentile ^e		0.0104	0.00722	0.69
	Highest ^f		0.0286	0.0142	0.50
Children					
Urban	Lowest ^b		0.0185	0.0469	2.5
	5th percentile ^c		0.177	0.342	1.9
	Median ^d		0.0120	0.00667	0.56
	95th percentile ^e		0.00754	0.00461	0.61
	Highest ^f		0.0818	0.0137	0.17
Rural	Lowest ^b		0.00481	0.00932	1.9
	5th percentile ^c		0.00631	0.00670	1.1
	Median ^d		0.0155	0.0189	1.2
	95th percentile ^e		0.0237	0.0153	0.65
	Highest ^f		0.0188	0.00786	0.42

^aCalculated according to the method of Fenske et al. [37]

^bAbsorbed dose estimates for the participant with the lowest creatinine excretion rate

^cAbsorbed dose estimates for the participant with the creatinine excretion rate closest to the 5th percentile value

^dAbsorbed dose estimates for the participants with the median creatinine excretion rate

^eAbsorbed dose estimates for the participant with the creatinine excretion rate closest to the 95th percentile value

^fAbsorbed dose estimates for the participant with the highest creatinine excretion rate

Table 7 - Absorbed permethrin dose estimated from creatinine-adjusted concentrations (C2) and amounts (A) of DCCA

	Relative creatinine excretion rate	Permethrin absorbed dose		
		(A) Estimated from cumulative amounts (µg/kg bw/day)	(C2) Estimated from creatinine-adjusted concentrations ^a (µg/kg bw/day)	C2/A
Adults				
Urban				
	Lowest ^b	0.00625	0.0120	1.9
	5th percentile ^c	0.00749	0.0145	1.9
	Median ^d	0.835	0.807	0.97
	95th percentile ^e	0.0153	0.0136	0.89
	Highest ^f	0.00912	0.00716	0.79
Rural				
	Lowest ^b	0.0164	0.0313	1.9
	5th percentile ^c	0.0136	0.0155	1.1
	Median ^d	0.0155	0.0170	1.1
	95th percentile ^e	0.0104	0.00730 ^g	0.73
	Highest ^f	0.0286	0.0103 ^g	0.36
Children				
Urban				
	Lowest ^b	0.0185	0.0256	1.4
	5th percentile ^c	0.177	0.5103	2.9
	Median ^d	0.0120	0.0113	0.94
	95th percentile ^e	0.00754	0.00465	0.62
	Highest ^f	0.0818	0.0315	0.39
Rural				
	Lowest ^b	0.00481	0.00674	1.4
	5th percentile ^c	0.00631	0.00650	1.0
	Median ^d	0.0155	0.0144	0.93
	95th percentile ^e	0.0237	0.0176	0.74
	Highest ^f	0.0188	0.0158	0.84

^aCalculated according to the method of Mage et al. [42]

^bAbsorbed dose estimates for the participant with the lowest creatinine excretion rate

^cAbsorbed dose estimates for the participant with the creatinine excretion rate closest to the 5th percentile value

^dAbsorbed dose estimates for the participants with the median creatinine excretion rate

^eAbsorbed dose estimates for the participant with the creatinine excretion rate closest to the 95th percentile value

^fAbsorbed dose estimates for the participant with the highest creatinine excretion rate

^gThis individual was obese (BMI > 30.0) and, in this specific case, Mage et al. [42] suggest to use lean body mass for the prediction of creatinine excretion

Effect of inter-individual variability in the urinary flow rate and creatinine excretion rate on the comparison of biomarker values between two populations

Table 8 shows the effect of the units of measurements (volume-weighted or creatinine adjusted concentrations) on results of the comparison of pyrethroid biomarker levels between two populations (urban versus rural). These results were compared to the reference ones obtained when assessing the difference between the two populations in hourly excretion rate values of pyrethroid metabolites normalized per unit of body weight ($\mu\text{g/h/kg}$ bw). Comparison conducted on the basis of volume-weighted concentrations of DCCA or PBA lead to results similar to those obtained on the basis of excretion rates of these metabolites.

Table 8 - Mann-Whitney comparisons of metabolite levels, expressed in different units, between urban and rural populations

Population and metabolite assessed	Statistical significance (p value) of comparisons between the urban and rural population		
	Comparison of weight-adjusted excretion rates (nmol/kg bw/h)	Comparison of volume-weighted concentrations (nmol/L)	Comparison of creatinine-adjusted concentrations ($\mu\text{mol/mol}$ of creatinine)
Adults			
DCCA	0.128	0.139	0.465
PBA	0.016*	0.010*	0.093
Children			
DCCA	0.032*	0.042*	0.029*
PBA	0.027*	0.023*	0.023*

*Indicates a significant difference

Comparison of pyrethroid levels between the urban and rural adult population on the basis of creatinine-adjusted DCCA and PBA concentrations lead to more divergent results. In particular, a non significant difference in PBA creatinine-adjusted concentrations was observed between the two groups contrary to what was observed on the basis of PBA excretion rates or volume-weighted concentrations. It was observed that the rural adult

population had a significantly higher creatinine excretion rate than the urban population ($p < 0.001$), which may have biased the test, whereas the distribution of the urinary flow rate was similar between the two groups ($p = 0.357$). In children, no significant difference in either the urinary flow rate or creatinine excretion rate was observed between the urban and rural population ($p = 0.081$ and 0.160 , respectively).

Discussion

The purpose of this research was to document the intra- and inter-individual variability in creatinine excretion rate and urinary flow rate in order to determine the relative impact of the different units of expression of pyrethroid biomarker data i) on reconstructed absorbed doses in individuals and ii) on results of comparisons of population biomonitoring data. This led to identify the most suitable units of expression of biomonitoring data and straightforward strategies for data collection in the case of non-persistent pesticides such as pyrethroids.

Intra-individual day-to-day variations in daily creatinine excretion (g/day) have been well documented [46, 47] but, to our knowledge, this is the first report of between-void variability in creatinine excretion rate and urinary flow rate during the course of a day. In an assessment of intra-individual day-to-day variations in creatinine excretion rate in 24-h urine collections based on several studies, Garde et al. [48] reported a coefficient of variation of 9-24%. However, void-to-void variations in creatinine excretion rate were not studied. Our findings demonstrate an important intra-individual variability in both the urinary flow rate (CV of 36.1 to 101%; max/min ratio of up to 18 fold) and creatinine excretion rate (CV of 6.0 to 48.4%; max/min ratio of up to 6.6. fold) during the course of a day in adults, the latter being larger than the day-to-day variations reported by Garde et al.

[48]. Those variations are likely the consequence of fluid intake for the former and dietary protein intake [36] and physical activity [49] for the latter. It has also been reported that variations in the urinary flow rate may explain as much as 21% of the creatinine variability [50], although this finding has been disputed. Our results suggest that there could be a difference of nearly a factor seven in creatinine-adjusted concentrations of a metabolite measured in two different urine samples taken the same day from a same individual solely due to the intra-individual intra-day variation in creatinine excretion rate.

Inter-individual variability in the urinary output and creatinine excretion rate has also been extensively studied; factors influencing these variations include age, gender, ethnicity, fat-free mass and height, ambient temperature, physical activity [31, 51, 52]. Garde et al. [48] reported coefficient of variations for inter-individual variations in creatinine excretion rate in 24-h urine collections ranging from 17-25%. In our study, using a shorter urine collection period (over a \pm 12-h nighttime collection), inter-individual variability in the urinary flow rate and creatinine excretion rate was further evaluated in 183 adults and 116 children from urban and rural areas. Creatinine excretion rate was found to be almost as variable (CV of 35.6 to 44.6%) as the urine volume (CV of 38.7-48.2%). This corresponds to a possible 9-fold (in adults) or 12-fold (in children) variation in the creatinine-adjusted concentrations of a metabolite solely due to the inter-individual variability in the creatinine-excretion rate. For urinary output, it implies that, if all adults absorbed the same dose of parent-compound, one could observe an 18-fold variation in metabolite concentrations solely due to inter-individual variations in the urine dilution. In children, the ratio between the more diluted and the more concentrated urines was about 6.

Results of our study show that variability in creatinine excretion and urinary output will directly influence the estimates of reconstructed absorbed dose of pyrethroids in an individual conducted on the basis of the volume-weighted or creatinine-adjusted concentrations of biomarkers. In 2007, Mage et al. [39] proposed a formula to predict daily creatinine excretion to estimate pesticide daily absorbed doses from creatinine-adjusted concentrations of metabolites in spot urine samples while accounting for inter-individual differences in age, gender, height and weight. Although this latter approach yields results closer to the cumulative amounts directly measured in urine than the approach used by Fenske et al. [37], it is nonetheless not very precise for individuals with marginal creatinine excretions (high or low), or atypical creatinine excretion (*i.e.* urinary creatinine excretion not well predicted by the formula), as observed in our study. In fact, errors in dose estimates based on creatinine-adjusted or volume-weighted concentrations can reach 500% or more in some cases.

It is to be noted that, in our estimation of the absorbed dose, the fraction of the dose recovered in urine as metabolites was not considered in dose reconstruction. This had no effect on our comparison of the different approaches for dose reconstruction but absolutely needs to be considered for accurate dose reconstruction and comparison with acceptable daily intakes.

With regard to the comparison of pyrethroid metabolite levels between two populations however, volume-weighted concentrations gave similar results to those obtained on the basis of cumulative amounts while discrepancies were observed between creatinine-adjusted concentrations and hourly excretion rates of some pyrethroid metabolites. When the urinary flow rates or creatinine excretion rates are normally distributed and not

significantly different from one population to the other, comparison of metabolite levels between two populations may give similar results whatever the unit of measurement (volume-weighted concentration, creatinine-adjusted concentration or cumulative amounts). Conversely, if a significant difference in the urinary output or in the creatinine excretion rate is observed, then discrepancies in the comparison results may be observed depending on the units of measurements.

For instance, adults from the rural population were heavier than the urban adults, and possibly more physically active, which may have affected their creatinine excretion rate, hence results of comparisons of creatinine-adjusted concentrations of metabolites between the two population samples. In another context, if one would compare concentrations of a pyrethroid metabolite in an Asian population to those of North-Americans on the basis of creatinine-adjusted values, significant differences could emerge due to variations in creatinine excretion rate as a result of differences in muscular mass between the two populations (higher stature of North-Americans compared to Asians). Barr et al. [31] described in details the factors influencing inter-individual creatinine variability in the US population and analyzed the influence of different factors, including ethnicity, gender and age, with a multiple linear regression model. They then stratified creatinine concentrations in their population (n = 22 245, NHANES) according to these factors, thus providing reference values for different subgroups of the US population. The application of the regression model elaborated by Barr et al. [31] in such a context might not be adequate since the coefficients were derived for people of different races, but living more or less in the same environment. Therefore, to verify adequately that there is no bias in the results of comparisons of exposure levels assessed on the basis of volume-weighted or creatinine-adjusted concentrations between populations from different countries, one also needs to

verify if there is a significant difference in the urinary flow rate or in the creatinine excretion rate, which requires timed collections. With timed-collections, metabolite excretion rate adjusted for the body weight can be directly determined and used for comparison of exposure between two populations instead of volume-weighted or creatinine-adjusted concentrations.

Conclusions

Overall, although it is more practical in field studies to determine concentrations of non-persistent pesticide metabolites in spot urine samples and adjust for creatinine contents, our results show that it may lead to serious errors in the estimation of the actual daily absorbed doses, particularly at the individual level. For a more accurate assessment of individual absorbed doses, we conclude that it is better to determine total amounts of metabolites in urine collected over the longest feasible and practical period of time. Collection of overnight urine voids (6 pm to first morning void) limits the risk of urine loss and participant attrition that increases with longer urine collection periods and allows a valid assessment of the 24-h excretion rate of pyrethroid metabolites.

Abbreviations

cDCCA, *cis*-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylic acid; tDCCA, *trans*-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylic acid; [DCCA], sum of molar concentrations (nmol/L) of the cDCCA and tDCCA (*cis/trans*) conformational isomers; CV, coefficient of variation; %CV, coefficient of variation expressed as a percentage; [DCCA]_{cr}, sum of creatinine-adjusted concentration (µg/g of creatinine) of cDCCA + tDCCA; DCE, daily creatinine excretion (g); DDCA_p, daily dose of permethrin

calculated from cumulative amounts of metabolite in urine ($\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{day}$); DDCAC_p , daily dose of permethrin calculated from creatinine-adjusted concentration of metabolite in urine ($\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{day}$); DDVWC_p , daily dose of permethrin calculated from volume weighted concentration of metabolite in urine ($\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{day}$); DUV , daily urinary volume (L); MAX , maximum; MAX/MIN , maximum to minimum ratio; MIN , minimum; MHER , metabolite excretion rate ; MW_{DCCA} , molecular weight of DCCA; MW_p , molecular weight of permethrin; OP , organophosphate; PBA , 3-phenoxybenzoic acid; \bar{x} mean.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests

Authors' contributions

MCF conceived the study and its design, carried out the analysis, interpreted the results and drafted the manuscript. MB conceived the study and its design, interpreted the results and contributed to draft the manuscript. GC participated in the interpretation of the results. All authors read and approved the final manuscript.

References

1. Bouchard M, Pinsonneault L, Tremblay C, Weber JP: **Biological monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in subjects living in the vicinity of a creosote impregnation plant.** *Int Arch Occup Environ Health* 2001, **74**:505-513.
2. Barr DB, Leng G, Berger-Preiss E, Hoppe HW, Weerasekera G, Gries W, Gerling S, Perez J, Smith K, Needham LL *et al*: **Cross validation of multiple methods for measuring pyrethroid and pyrethrum insecticide metabolites in human urine.** *Anal Bioanal Chem* 2007, **389**:811-818.
3. Meeker JD, Barr DB, Ryan L, Herrick RF, Bennett DH, Bravo R, Hauser R: **Temporal variability of urinary levels of nonpersistent insecticides in adult men.** *J Expo Anal Environ Epidemiol* 2005, **15**:271-281.
4. Fortin MC, Bouchard M, Carrier G, Dumas P: **Biological monitoring of exposure to pyrethrins and pyrethroids in a metropolitan population of the Province of Quebec, Canada.** *Environ Res* 2008, **107**:343-350.
5. Couture C: *Caractérisation de l'exposition aux pyréthrinoïdes dans la population rurale agricole de la Montérégie.* Montréal: Université de Montréal; 2008.
6. Saieva C, Aprea C, Tumino R, Masala G, Salvini S, Frasca G, Giurdanella MC, Zanna I, Decarli A, Sciarra G *et al*: **Twenty-four-hour urinary excretion of ten**

- pesticide metabolites in healthy adults in two different areas of Italy (Florence and Ragusa).** *Sci Total Environ* 2004, **332**:71-80.
7. Chester G, Hatfield LD, Hart TB, Leppert BC, Swaine H, Tummon OJ: **Worker exposure to, and absorption of, cypermethrin during aerial application of an "ultra low volume" formulation to cotton.** *Arch Environ Contam Toxicol* 1987, **16**:69-78.
 8. Berger-Preiss E, Levsen K, Leng G, Idel H, Sugiri D, Ranft U: **Indoor pyrethroid exposure in homes with woollen textile floor coverings.** *Int J Hyg Environ Health* 2002, **205**:459-472.
 9. Bouchard M, Carrier G, Brunet RC, Dumas P, Noisel N: **Biological monitoring of exposure to organophosphorus insecticides in a group of horticultural greenhouse workers.** *Ann Occup Hyg* 2006, **50**:505-515.
 10. Bouchard M, Gosselin NH, Brunet RC, Samuel O, Dumoulin MJ, Carrier G: **A toxicokinetic model of malathion and its metabolites as a tool to assess human exposure and risk through measurements of urinary biomarkers.** *Toxicol Sci* 2003, **73**:182-194.
 11. Tuomainen A, Kangas JA, Meuling WJ, Glass RC: **Monitoring of pesticide applicators for potential dermal exposure to malathion and biomarkers in urine.** *Toxicol Lett* 2002, **134**:125-132.

12. Lu C, Barr DB, Pearson M, Bartell S, Bravo R: **A longitudinal approach to assessing urban and suburban children's exposure to pyrethroid pesticides.** *Environ Health Perspect* 2006, **114**:1419-1423.
13. Ahn KC, Lohstroh P, Gee SJ, Gee NA, Lasley B, Hammock BD: **High-throughput automated luminescent magnetic particle-based immunoassay to monitor human exposure to pyrethroid insecticides.** *Anal Chem* 2007, **79**:8883-8890.
14. Baker SE, Olsson AO, Barr DB: **Isotope dilution high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantifying urinary metabolites of synthetic pyrethroid insecticides.** *Arch Environ Contam Toxicol* 2004, **46**:281-288.
15. Heudorf U, Angerer J: **Metabolites of pyrethroid insecticides in urine specimens: current exposure in an urban population in Germany.** *Environ Health Perspect* 2001, **109**:213-217.
16. Heudorf U, Angerer J, Drexler H: **Current internal exposure to pesticides in children and adolescents in Germany: urinary levels of metabolites of pyrethroid and organophosphorus insecticides.** *Int Arch Occup Environ Health* 2004, **77**:67-72.
17. Heudorf U, Butte W, Schulz C, Angerer J: **Reference values for metabolites of pyrethroid and organophosphorous insecticides in urine for human biomonitoring in environmental medicine.** *Int J Hyg Environ Health* 2006, **209**:293-299.

18. Leng G, Ranft U, Sugiri D, Hadnagy W, Berger-Preiss E, Idel H: **Pyrethroids used indoors--biological monitoring of exposure to pyrethroids following an indoor pest control operation.** *Int J Hyg Environ Health* 2003, **206**:85-92.
19. Schettgen T, Heudorf U, Drexler H, Angerer J: **Pyrethroid exposure of the general population-is this due to diet.** *Toxicol Lett* 2002, **134**:141-145.
20. Schettgen T, Koch HM, Drexler H, Angerer J: **New gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of urinary pyrethroid metabolites in environmental medicine.** *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002, **778**:121-130.
21. Berkowitz GS, Obel J, Deych E, Lapinski R, Godbold J, Liu Z, Landrigan PJ, Wolff MS: **Exposure to indoor pesticides during pregnancy in a multiethnic, urban cohort.** *Environ Health Perspect* 2003, **111**:79-84.
22. Hardt J, Angerer J: **Biological monitoring of workers after the application of insecticidal pyrethroids.** *Int Arch Occup Environ Health* 2003, **76**:492-498.
23. Smith PA, Thompson MJ, Edwards JW: **Estimating occupational exposure to the pyrethroid termiticide bifenthrin by measuring metabolites in urine.** *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002, **778**:113-120.
24. Wang D, Kamijima M, Imai R, Suzuki T, Kameda Y, Asai K, Okamura A, Naito H, Ueyama J, Saito I *et al*: **Biological monitoring of pyrethroid exposure of pest control workers in Japan.** *J Occup Health* 2007, **49**:509-514.

25. Arcury TA, Quandt SA, Barr DB, Hoppin JA, McCauley L, Grzywacz JG, Robson MG: **Farmworker exposure to pesticides: methodologic issues for the collection of comparable data.** *Environ Health Perspect* 2006, **114**:923-928.
26. Barr DB, Thomas K, Curwin B, Landsittel D, Raymer J, Lu C, Donnelly KC, Acquavella J: **Biomonitoring of exposure in farmworker studies.** *Environ Health Perspect* 2006, **114**:936-942.
27. Nakamura S, Kobayashi Y, Tozuka K, Tokue A, Kimura A, Hamada C: **Circadian changes in urine volume and frequency in elderly men.** *J Urol* 1996, **156**:1275-1279.
28. Ryan WL: **Urine volume and the menstrual cycle.** *Fertil Steril* 1961, **12**:277-281.
29. Singh R, Singh RK, Mahdi AA, Saxena SP, Cornelissen G, Halberg F: **Circadian periodicity of urinary volume, creatinine and 5-hydroxyindole acetic acid excretion in healthy Indians.** *Life Sci* 2000, **66**:209-214.
30. Van Hoeck K, Bael A, Lax H, Hirche H, van Gool JD: **Circadian variation of voided volume in normal school-age children.** *Eur J Pediatr* 2007, **166**:579-584.
31. Barr DB, Wilder LC, Caudill SP, Gonzalez AJ, Needham LL, Pirkle JL: **Urinary creatinine concentrations in the U.S. population: implications for urinary biologic monitoring measurements.** *Environ Health Perspect* 2005, **113**:192-200.

32. Calles-Escandon J, Cunningham JJ, Snyder P, Jacob R, Huszar G, Loke J, Felig P: **Influence of exercise on urea, creatinine, and 3-methylhistidine excretion in normal human subjects.** *Am J Physiol* 1984, **246**:E334-338.
33. Hellerstein S, Hunter JL, Warady BA: **Creatinine excretion rates for evaluation of kidney function in children.** *Pediatr Nephrol* 1988, **2**:419-424.
34. Mori Y, Hiraoka M, Suganuma N, Tsukahara H, Yoshida H, Mayumi M: **Urinary creatinine excretion and protein/creatinine ratios vary by body size and gender in children.** *Pediatr Nephrol* 2006, **21**:683-687.
35. Neubert A, Remer T: **The impact of dietary protein intake on urinary creatinine excretion in a healthy pediatric population.** *J Pediatr* 1998, **133**:655-659.
36. Kesteloot HE, Joossens JV: **Relationship between dietary protein intake and serum urea, uric acid and creatinine, and 24-hour urinary creatinine excretion: the BIRNH Study.** *J Am Coll Nutr* 1993, **12**:42-46.
37. Fenske RA, Kissel JC, Lu C, Kalman DA, Simcox NJ, Allen EH, Keifer MC: **Biologically based pesticide dose estimates for children in an agricultural community.** *Environ Health Perspect* 2000, **108**:515-520.
38. Mage DT, Allen RH, Gondy G, Smith W, Barr DB, Needham LL: **Estimating pesticide dose from urinary pesticide concentration data by creatinine correction in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES-III).** *J Expo Anal Environ Epidemiol* 2004, **14**:457-465.

39. Mage DT, Allen RH, Kodali A: **Creatinine corrections for estimating children's and adult's pesticide intake doses in equilibrium with urinary pesticide and creatinine concentrations.** *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2008, **18**:360-368.
40. Curwin BD, Hein MJ, Sanderson WT, Striley C, Heederik D, Kromhout H, Reynolds SJ, Alavanja MC: **Pesticide dose estimates for children of Iowa farmers and non-farmers.** *Environ Res* 2007, **105**:307-315.
41. Eadsforth CV, Baldwin MK: **Human dose-excretion studies with the pyrethroid insecticide, cypermethrin.** *Xenobiotica* 1983, **13**:67-72.
42. Kissel JC, Curl CL, Kedan G, Lu C, Griffith W, Barr DB, Needham LL, Fenske RA: **Comparison of organophosphorus pesticide metabolite levels in single and multiple daily urine samples collected from preschool children in Washington State.** *J Expo Anal Environ Epidemiol* 2005, **15**:164-171.
43. Bouchard M, Carrier G, Brunet RC: **Assessment of absorbed doses of carbaryl and associated health risks in a group of horticultural greenhouse workers.** *Int Arch Occup Environ Health* 2008, **81**:355-370.
44. Meites S, *American Association for Clinical Chemistry.: Pediatric clinical chemistry : a survey of reference (normal) values, methods, and instrumentation, with commentary, 2d edn.* Winston-Salem, N. C.: American Association for Clinical Chemistry; 1981.

45. Commission internationale de protection contre les radiations. Task Group on Reference Man.: *Report of the Task Group on Reference Man : A report*. Oxford ; Toronto: Pergamon Press; 1975.
46. Gowans EM, Fraser CG: **Biological variation of serum and urine creatinine and creatinine clearance: ramifications for interpretation of results and patient care.** *Ann Clin Biochem* 1988, **25**:259-263.
47. Greenblatt DJ, Ransil BJ, Harmatz JS, Smith TW, Duhme DW, Koch-Weser J: **Variability of 24-hour urinary creatinine excretion by normal subjects.** *J Clin Pharmacol* 1976, **16**:321-328.
48. Garde AH, Hansen AM, Kristiansen J, Knudsen LE: **Comparison of uncertainties related to standardization of urine samples with volume and creatinine concentration.** *Ann Occup Hyg* 2004, **48**:171-179.
49. Radha E, Bessman SP: **Effect of exercise on protein degradation: 3-methylhistidine and creatinine excretion.** *Biochem Med* 1983, **29**:96-100.
50. Greenberg GN, Levine RJ: **Urinary creatinine excretion is not stable: a new method for assessing urinary toxic substance concentrations.** *J Occup Med* 1989, **31**:832-838.
51. Boeniger MF, Lowry LK, Rosenberg J: **Interpretation of urine results used to assess chemical exposure with emphasis on creatinine adjustments: a review.** *Am Ind Hyg Assoc J* 1993, **54**:615-627.

52. Remer T, Neubert A, Maser-Gluth C: **Anthropometry-based reference values for 24-h urinary creatinine excretion during growth and their use in endocrine and nutritional research.** *Am J Clin Nutr* 2002, **75**:561-569.

Contribution des auteurs

Marie-Chantale Fortin : a conçu et réalisé l'étude, interprété les résultats, rédigé la version originale du manuscrit original et effectué les révisions.

Michèle Bouchard : a contribué à la conception de l'étude et à l'interprétation des résultats et révisé le manuscrit original et ses révisions.

Gaétan Carrier : a contribué à la conception de l'étude, à l'interprétation des résultats et à la révision du manuscrit original.

Chapitre 3

Discussion générale

3. Discussion générale

Les travaux de recherche présentés dans cette thèse fournissent aux organismes gouvernementaux et aux intervenants en santé publique une stratégie nouvelle de mesure d'indicateurs biologiques de l'exposition aux pyréthrinoïdes et aux pyréthrines. Cette approche, basée sur la mesure des quantités de métabolites de ces contaminants exprimées en pmol/kg pc/12 h, a l'avantage de ne pas être influencée pas les variations interindividuelles dans la dilution urinaire, l'excrétion de la créatinine, la durée de collecte et le poids corporel. Cette stratégie a été appliquée avec succès sur des échantillons urinaires de populations adultes et infantiles de milieu urbain et rural afin de combler le manque de connaissances sur l'importance de l'exposition aux pyréthrinoïdes et aux pyréthrines au Québec. Ces études ont d'ailleurs permis de démontrer la faisabilité et de la validité de cette approche dans divers contextes et ont en plus fourni les données biologiques nécessaires à la comparaison de différentes stratégies d'évaluation de l'exposition par la mesure de biomarqueurs urinaires. Dans les prochaines pages, l'apport scientifique des articles inclus dans cette thèse sera présenté plus en détails.

3.1 Acquisition de données sur l'étendue de l'exposition aux pyréthrinoïdes et aux pyréthrines dans la population québécoise par la mesure de biomarqueurs urinaires

Considérant la toxicité des pyréthrinoïdes et des pyréthrines, les travaux de cette thèse ont permis de combler un manque important de données relatives à l'étendue de l'exposition à ces pesticides en milieu urbain et rural au Québec (articles 1 et 2, respectivement). L'utilisation de protocoles de collecte identiques dans les deux régions (l'Île de Montréal et la Montérégie) et la mesure des quantités urinaires de biomarqueurs en pmol/ kg pc/12 h

ont également permis de comparer avec une bonne validité interne les niveaux de biomarqueurs d'exposition dans les populations vivant dans ces milieux (article 3).

Ces données biologiques d'exposition pour les pyréthriinoïdes et les pyréthrines sont donc les premières à avoir été colligées en utilisant une unité permettant de contrôler pour les plus importants facteurs individuels de modification, autres que l'exposition, soit la dilution urinaire, l'excrétion de la créatinine, la variation dans la durée de la collecte et la variation du poids corporels. Dans toutes les études publiées auparavant, ces facteurs n'avaient jamais tous été contrôlés (Heudorf et Angerer, 2001; Heudorf *et al.*, 2004; Becker *et al.*, 2006; Saieva *et al.*, 2004; Bradman *et al.*, 1997; CDC, 2005). Cette stratégie permet donc l'obtention d'un portrait plus valide de la distribution de l'exposition telle qu'évaluée par la mesure de ces biomarqueurs urinaires.

Un autre élément novateur est la mesure de l'acide chrysanthémumdioïque (CDCA). En effet, dans toutes les études publiées à ce jour et portant sur la mesure de biomarqueurs urinaires de cette gamme d'insecticides, une seule avait mesuré cet unique métabolite des pyréthrines et de pyréthriinoïdes (voir tableau 3). En effet, (Leng *et al.*, 2006) avaient mesuré ce métabolite dans un petit échantillon ($n = 45$) de la population générale en Allemagne. Pour les travaux de cette thèse, une collaboration avec un professeur de chimie de l'Université (André Charette) a permis l'obtention de l'étalon nécessaire à la mesure de ce métabolite (dont les spectres de résonance magnétique nucléaire et infrarouge sont présentés en annexe). Les analyses biochimiques réalisées sur les échantillons urinaires provenant de milieux urbain et rural au Québec ont d'ailleurs montré que ce métabolite était le quatrième en importance (après les tDCCA, cDCCA et PBA). Il était en effet au-dessus du seuil de détection analytique dans une proportion des échantillons allant jusqu'à

75 %. Par ailleurs, les seuils analytiques de détection (dont la méthode est décrite en détails dans l'article 1) sont les plus bas publiés à ce jour, conférant à toute la méthode une grande sensibilité.

Brièvement, nos résultats indiquent que l'exposition à ces pesticides est ubiquiste au Québec et l'analyse des données qualitatives colligées dans les questionnaires suggère que la source principale d'exposition dans la population générale serait en fait l'alimentation. En effet, les autres sources d'exposition (telles que l'extermination ou l'utilisation de pesticides domestiques) n'ont été rapportées que rarement. Par contre, nos données indiquent que dans certaines circonstances, ces autres sources pourraient contribuer à augmenter l'exposition individuelle de façon significative (notamment, lors de l'utilisation de shampoing contre les poux (article 1)). Par ailleurs, certains facteurs comportementaux plus fréquents en Montérégie (comme l'usage de pesticides domestiques et de chasse-moustiques) pourraient aussi être à l'origine du niveau d'exposition apparemment plus élevé dans cette région que sur l'Île de Montréal (article 3).

Il est à noter que, tant en milieu urbain que rural, les estimations de l'exposition quotidienne calculées à partir des quantités de métabolites excrétés dans les urines se retrouvent sous les seuils établis (*Acceptable Daily Intake (ADI) ou Reference Dose (RfD)*)¹ par les organismes gouvernementaux tels que l'US EPA et Santé Canada. Cette constatation demeure, même après l'application d'un facteur de correction qui tient compte de la fraction de la dose d'exposition se retrouvant dans les urines (dérivée des données présentées dans l'introduction). Il est primordial, lors de l'estimation de la dose

¹ À titre indicatif, la RfD par voie orale pour la perméthrine, qui est le pyréthrianoïde le plus vastement utilisé, est de 0,05 mg/kg/jour (50µg/kg/jour) (EPA, 1992) et les RfD et ADI actuels pour les autres pyréthrianoïdes se situent également dans cet ordre de grandeur (0,01-0,05 mg/kg/jour).

d'exposition de tenir compte de ce facteur de correction puisque sinon, les quantités estimées seront une sous-estimation de la valeur réelle. Ceci est vrai, en particulier s'il s'agit d'estimations réalisées pour des individus pour lesquels une exposition importante est suspectée.

Il serait naturellement pertinent de reprendre les analyses de surveillance biologique dans d'autres échantillons de la population et à d'autres périodes de l'année afin de vérifier s'il y a une variation saisonnière dans le niveau d'exposition absolu et relatif entre les populations de différents milieux. Il serait aussi pertinent de vérifier s'il y a des différences entre les diverses tranches socioéconomiques. Par ailleurs, les sources d'exposition devraient également être investiguées plus en profondeur afin de les identifier et de les minimiser.

3.2 Considérations méthodologiques relatives à l'utilisation de biomarqueurs urinaires en santé environnementale

Le choix d'un protocole expérimental a d'importantes répercussions sur la validité des résultats et sur les généralisations qu'il est possible de faire à partir de ces résultats. En santé environnementale, l'utilisation de biomarqueurs urinaires est largement répandue puisque cette approche permet d'intégrer toutes les sources d'exposition et ainsi d'éviter le laborieux échantillonnage environnemental. Les biomarqueurs urinaires sont même utilisés pour extrapoler vers des valeurs d'exposition quotidiennes mais la validité de ces extrapolations n'avait jamais été systématiquement évaluée. Les données biologiques colligées dans les trois premiers articles ont donc servi à la démonstration que les unités usuelles de mesure de biomarqueurs urinaires (concentrations volumiques ou ajustées pour

la créatinine) peuvent en fait mener à d'importantes erreurs lors de l'estimation des doses absorbées et lors de la comparaison de données provenant de différentes populations (article 4).

Puisqu'il est fréquent de souhaiter estimer la dose quotidienne d'exposition à partir des valeurs de biomarqueurs urinaires afin de la comparer à des valeurs de référence (*ADI ou RfD*), des approches d'estimation de dose à partir des concentrations de biomarqueurs urinaires ont été publiées pour certains pesticides ayant une demi-vie relativement courte comme les organophosphorés (Fenske *et al.*, 2000; Mage *et al.*, 2004; Mage *et al.*, 2008). Les auteurs de ces approches proposent donc d'utiliser les concentrations volumiques ou ajustées pour la créatinine des biomarqueurs d'intérêts mesurés dans un échantillon d'urine ponctuel (1^{ère} urine du matin si possible) afin d'extrapoler vers des quantités quotidiennes.

Or, les importantes variations intra-individuelles dans le débit urinaire horaire (miction-à-miction) et le taux d'excrétion horaire de la créatinine (miction-à-miction) font en sorte que, pour un même individu, les doses absorbées estimées sur la base des concentrations mesurées dans une miction pourraient différer considérablement de celles estimées à partir d'une autre miction prise la même journée. Cette constatation a un impact considérable en santé environnementale et met en valeur l'importance de recueillir les urines totales pendant une période de temps suffisante (12 à 15 heures pour les pyréthriinoïdes) afin d'obtenir une indication aussi valide que possible de l'exposition et de pouvoir comparer celle-ci avec confiance aux valeurs de référence établies.

L'utilisation d'une période de collecte urinaire plus longue (de 12 heures et plus) a par ailleurs un autre avantage. En effet, dans l'article 1, il a été démontré que les quantités

excrétées dans les urines recueillies pendant la période s'étalant entre 18 heures et le lever du lendemain (inclusivement) avaient une bonne valeur prédictive des quantités qui seraient excrétées pendant 24 heures. Ainsi, dans le cas de substances ayant des demi-vies d'élimination relativement courtes comme les pyréthriinoïdes (c'est-à-dire variant environ entre 4 et 7 h chez l'homme (Gotoh *et al.*, 1998; Leng *et al.*, 1997; Leng *et al.*, 2006) il est souhaitable – et réaliste – de demander aux participants de recueillir leurs urines pendant cette période de temps (18 h jusqu'au levé le lendemain), ce qui correspond, pour la majorité des gens, au temps passé à la maison dans une journée.

Ces résultats s'appliquent aux pyréthriinoïdes et aux pyréthrines et probablement à d'autres molécules ayant des demi-vies similaires. L'exercice comparatif devrait être repris pour des molécules sentinelles ayant des demi-vies plus courtes et plus longues afin de compléter le portrait de l'influence des variations dans la dilution urinaire et dans l'excrétion de la créatinine sur l'estimation individuelle des doses absorbées à partir de concentrations volumique ou ajustées pour la créatinine. Par ailleurs, ces résultats devraient être pris en compte dans toutes les études de surveillance biologique et en particulier lorsqu'il s'agit de populations ou d'individus « à risque ».

Un autre point d'importance pour la recherche en santé environnementale est que le choix de l'unité de l'expression des niveaux de biomarqueurs a un impact les résultats de comparaisons effectuées entre deux échantillons de population. En effet, tel que démontré dans l'article 4, la comparaison des niveaux de métabolites de pyréthriinoïdes entre les échantillons urbain et rural effectuée sur la base des concentrations volumiques, des concentrations ajustées pour la créatinine ou des quantités en pmol/kg pc/12 h ne menaient pas aux mêmes conclusions. En d'autres termes, une différence observée lors des

comparaisons effectuées sur les quantités et les concentrations volumiques de biomarqueurs de pyréthriinoïdes ne l'était pas lors de la comparaison des concentrations ajustées pour la créatinine. L'analyse plus spécifique a démontré que l'excrétion de la créatinine, plus élevée en milieu rural, contrebalançait l'effet de l'excrétion urinaire plus importante du PBA dans cette population, ce qui prévenait la détection d'une relation statistiquement significative.

Les comparaisons effectuées sur les bases de concentrations volumiques ou de concentrations ajustées pour la créatinine des métabolites urinaires de pesticides ne sont donc valides que si, et seulement si, il n'y a pas, entre les deux populations à l'étude, de différences significatives dans le débit urinaire horaire ou dans le taux d'excrétion horaire de la créatinine, respectivement. Ainsi, des facteurs influençant le débit urinaire (tels que les conditions ambiantes (température, humidité) et l'état d'hydratation) ou l'excrétion urinaire de la créatinine (tels que la stature, la composition ethnique, la charge de travail physique et la consommation de protéines) peuvent entraîner de la confusion dans les résultats des comparaisons des niveaux de biomarqueurs effectuées entre deux échantillons.

En somme, les comparaisons de niveaux de biomarqueurs entre des échantillons de populations *peuvent* ne pas être valides si elles sont effectuées sur la base des concentrations volumiques ou ajustées pour la créatinine et qu'il y a des différences significatives dans le débit urinaire ou dans le taux d'excrétion de la créatinine entre les deux groupes. Cette constatation a un impact non négligeable sur les pratiques en santé environnementale et remet en question les paradigmes sur lesquels sont fondés la surveillance biologique, ici, mais aussi partout dans le monde.

La mesure de biomarqueurs urinaires à l'immense avantage d'intégrer toutes les voies d'exposition et d'obtenir ainsi un portrait global de la situation. Les travaux constituant cette thèse proposent une approche novatrice et plus précise qui permet d'éviter de nombreux biais précédemment considérés intrinsèques à la mesure d'indicateurs biologiques de l'exposition. Cette approche d'estimation de la dose absorbée de pyréthriinoïdes et pyréthrines, basée sur les quantités de métabolites excrétées dans l'urine, pourrait toutefois bénéficier de quelques améliorations. En particulier, il serait pertinent de mieux documenter la toxicocinétique, et en particulier le métabolisme, de ces molécules chez l'humain. En effet, les données toxicocinétiques actuellement disponibles ne contiennent que très peu d'informations sur le métabolisme chez l'humain; elles ne combinent pas les profils urinaires et sanguins et ne permettent donc pas d'évaluer la fraction excrétée dans les fèces.

Il serait donc souhaitable d'identifier la proportion des différents états d'oxydation des métabolites et des différents conjugués produits et de combler les autres lacunes cinétiques en effectuant une étude chez des volontaires. À ce propos, il serait notamment possible, grâce à la tomographie par émission de positrons, d'étudier et de quantifier en temps réel la distribution dans les tissus (adipeux, muscles, système nerveux central, foie, peau, etc.) des différents isomères ou de leurs métabolites ce qui permettrait d'établir avec une très grande précision les relations entre les quantités se retrouvant aux différentes cibles cellulaires, celles se retrouvant dans les urines et les fèces et celles ayant été absorbées.

Références

- Becker K, Seiwert M, Angerer J, Kolossa-Gehring M, Hoppe HW, Ball M, Schulz C, Thumulla J et Seifert B (2006). *Geres iv pilot study: Assessment of the exposure of german children to organophosphorus and pyrethroid pesticides*. Int J Hyg Environ Health **209**(3): 221-33.
- Bradman MA, Harnly ME, Draper W, Seidel S, Teran S, Wakeham D et Neutra R (1997). *Pesticide exposures to children from california's central valley: Results of a pilot study*. J Expo Anal Environ Epidemiol **7**(2): 217-34.
- CDC (2005). *Third national report on human exposure to environmental chemicals*. Atlanta (GA), Center for Disease Control and Prevention.
- Fenske RA, Kissel JC, Lu C, Kalman DA, Simcox NJ, Allen EH et Keifer MC (2000). *Biologically based pesticide dose estimates for children in an agricultural community*. Environ Health Perspect **108**(6): 515-20.
- Gotoh Y, Kawakami M, Matsumoto N et Okada Y (1998). *Permethrin emulsion ingestion: Clinical manifestations and clearance of isomers*. J Toxicol Clin Toxicol **36**(1-2): 57-61.
- Heudorf U et Angerer J (2001). *Metabolites of pyrethroid insecticides in urine specimens: Current exposure in an urban population in Germany*. Environ Health Perspect **109**(3): 213-7.
- Heudorf U, Angerer J et Drexler H (2004). *Current internal exposure to pesticides in children and adolescents in germany: Urinary levels of metabolites of pyrethroid and organophosphorus insecticides*. Int Arch Occup Environ Health **77**(1): 67-72.
- Leng G, Gries W et Selim S (2006). *Biomarker of pyrethrum exposure*. Toxicol Lett **162**(2-3): 195-201.

- Leng G, Leng A, Kuhn KH, Lewalter J et Pauluhn J (1997). *Human dose-excretion studies with the pyrethroid insecticide cyfluthrin: Urinary metabolite profile following inhalation*. Xenobiotica **27**(12): 1273-83.
- Mage DT, Allen RH, Gondy G, Smith W, Barr DB et Needham LL (2004). *Estimating pesticide dose from urinary pesticide concentration data by creatinine correction in the third national health and nutrition examination survey (nhanes-iii)*. J Expo Anal Environ Epidemiol **14**(6): 457-65.
- Mage DT, Allen RH et Kodali A (2008). *Creatinine corrections for estimating children's and adult's pesticide intake doses in equilibrium with urinary pesticide and creatinine concentrations*. J Expo Sci Environ Epidemiol **18**(4): 360-8.
- Saieva C, Aprea C, Tumino R, Masala G, Salvini S, Frasca G, Giurdanella MC, Zanna I, Decarli A, Sciarra G et Palli D (2004). *Twenty-four-hour urinary excretion of ten pesticide metabolites in healthy adults in two different areas of italy (florence and ragusa)*. Sci Total Environ **332**(1-3): 71-80.

Annexes

**Annexe 1. Principaux insectes (ou autres organismes) cibles des différents pyréthriinoïdes
et pyréthrines employées au Québec**

Pyréthriinoïde ou pyréthrine	Insectes cibles ou organisme apparenté contrôlés.	Source*
Alléthrine	Moustiques, guêpes, mouches, araignées, centipèdes, scarabées japonais, chenilles, thrips, cicadelles, grillons drosophiles, pyrales, blattes, poissons d'argent, anthrènes des tapis, punaises des lits.	RPPQ
Cyhalothrine-λ	Punaises des lits, scarabées, mouches, puces, poux, moustiques, lépidoptères, charançons.	TPPP
Cyperméthrine	Mouches des cornes, mouches faciales, blattes, altises (des crucifères), légionnaires Bertha, chrysomèles du tournesol, cicadelles (de la pomme de terre; du raisin), bruches de tournesol, pyrales du maïs, criocères de l'asperge, mouches (de la carotte; de l'oignon; de la pomme), vers de l'épis de maïs, tordeuse de la vigne, fausses-arpenteuse du chou, thrips, fausses-teignes des crucifères, pique-bouton enrouleuse, charançons de la prune, carpocapses de la pomme, psylles du poirier, anthonomes de la fleur du fraisier, punaises ternes, cercoptes des prés.	RPPQ
Deltaméthrine	Chrysomèles du tournesol, sauterelles (nymphe), thrips des petits fruits, pucerons (nerprun; pomme de terre; pommier), altises, doryphores (larve et adulte), altises de la pomme de terre, punaises ternes, charançons, arpeuteuse (tardives; de Bruce), criocères de l'asperge, psylles du poirier, tordeuse (à bande oblique; pâles du pommier), enrouleuses, fausses-teignes des crucifères, fausses-arpenteuses du chou, boutons du pommier, cicadelles blanches du pommier, pyrales du maïs.	RPPQ
Fenvalérate	Mouches des cornes, mouches faciales	RPPQ
Flucythrinate	Ver (de la capsule; des feuilles (larves de lépidoptères)), mouches blanches, blattes, cochenille	TPPP
Fluvalinate	Aphidiens, cicadelle, lépidoptères, araignées rouges (tétranyques), thrips, mouches blanches.	TPPP
Perméthrine	Vers-gris (moissonneurs; blancs; noirs; orthogonales; à dos rouge), légionnaires grises, fausses arpeuteuses, piérides du chou, larves de la fausse teigne des crucifères, altises (des crucifères; de la pomme de terre), sciarides, vers de l'épi de maïs, pyrales du maïs, doryphores de la pomme de terre, sphynx de la tomate, punaises ternes, cicadelles de la pomme de terre.	RPPQ
Pyréthrines	Mouches, blattes, fourmis, maringouins, punaises des lits, poissons d'argent, mites, araignées, charançons du riz, pyrales indiennes de la farine, cucujides (dentelés des grains; plats) lasiodermes du tabac, triboliums bruns de la farine, puces.	RPPQ
Resméthrine	Mouches, maringouins, guêpes, frelons, fourmis, blattes, pucerons, thrips, aleurodes, cicadelles, scarabées japonais, araignées, mites, attagènes des tapis.	RPPQ
Tefluthrine	Scarabées, mouches, moustiques, lépidoptères, charançons.	TPPP
Tetraméthrine	Guêpes, frelons, mouches, moustiques, blattes, mites, araignées, grillons, fourmis, attagènes des lits, centipèdes, poissons d'argent, puces cicadelles, tétranyques, pucerons, chenilles, scarabées japonais, tarsonèmes du fraisier, tisseuses, mouches blanches.	RPPQ

* **RPPQ** : Répertoire des principaux pesticides utilisés au Québec, Ministère de l'environnement, des pêches et de l'agriculture du Québec, 2002. **TPPP** : Toxicological profile for pyrethrins and pyrethroids, Agency for toxic substances and disease registry, 2003.

Annexe 2. Type de pyréthriinoïde et activité *in vitro* et *in vivo*

Pyréthriinoïde ou pyréthrines	Type de pyréthriinoïde	Syndrome observé <i>in vivo</i> ^a	Effet <i>in vitro</i> ^b		DL ₅₀ orales ^c (mg/kg)	Source*
			Activation	Inactivation		
Alléthrine	I		Rapide	Observée	920	INCHEM
Cyhalothrine-λ	II		Lente	Non observée	79	Exttoxnet
Cyperméthrine	II	CS	Lente	Non observée	187	Exttoxnet
Deltaméthrine	II	CS	Lente	Non observée	52	INCHEM
Fenvalérate	II	CS	Lente	Non observée	300	INCHEM
Flucythrinate	II			Non testé	81	INCHEM
Fluvalinate	II			Non testé	261	Exttoxnet
Perméthrine	I	T	Rapide	Observée	280	INCHEM
Pyréthrines	(I)			Non testé	200	Exttoxnet
Resméthrine	I	T		Non testé	1244	Exttoxnet
Tefluthrine	I		Rapide	Observée	22 ^d	USEPA
Tetraméthrine	I			Non testé	>5000	INCHEM

^a Verschoyle et Aldridge 1980, effets chez des rats Wistar femelles de type albinos Porton

^b Choi *et al.* 2006, dans des canaux Na_v1.8 de rat exprimés dans des oocytes de *Xenopus*.

^c Plus basses DL₅₀ orales rapportées chez des rats males. La DL₅₀ est la dose létale pour 50/100 et correspond à la dose qui entraîne la mort de la moitié de l'échantillon à l'étude dans cette condition.

^d Donnée de l'USEPA, Tefluthrin; Pesticide Tolerance, final rule from the Federal Register: <http://www.epa.gov/EPA-PEST/1997/November/Day-26/p30946.html>

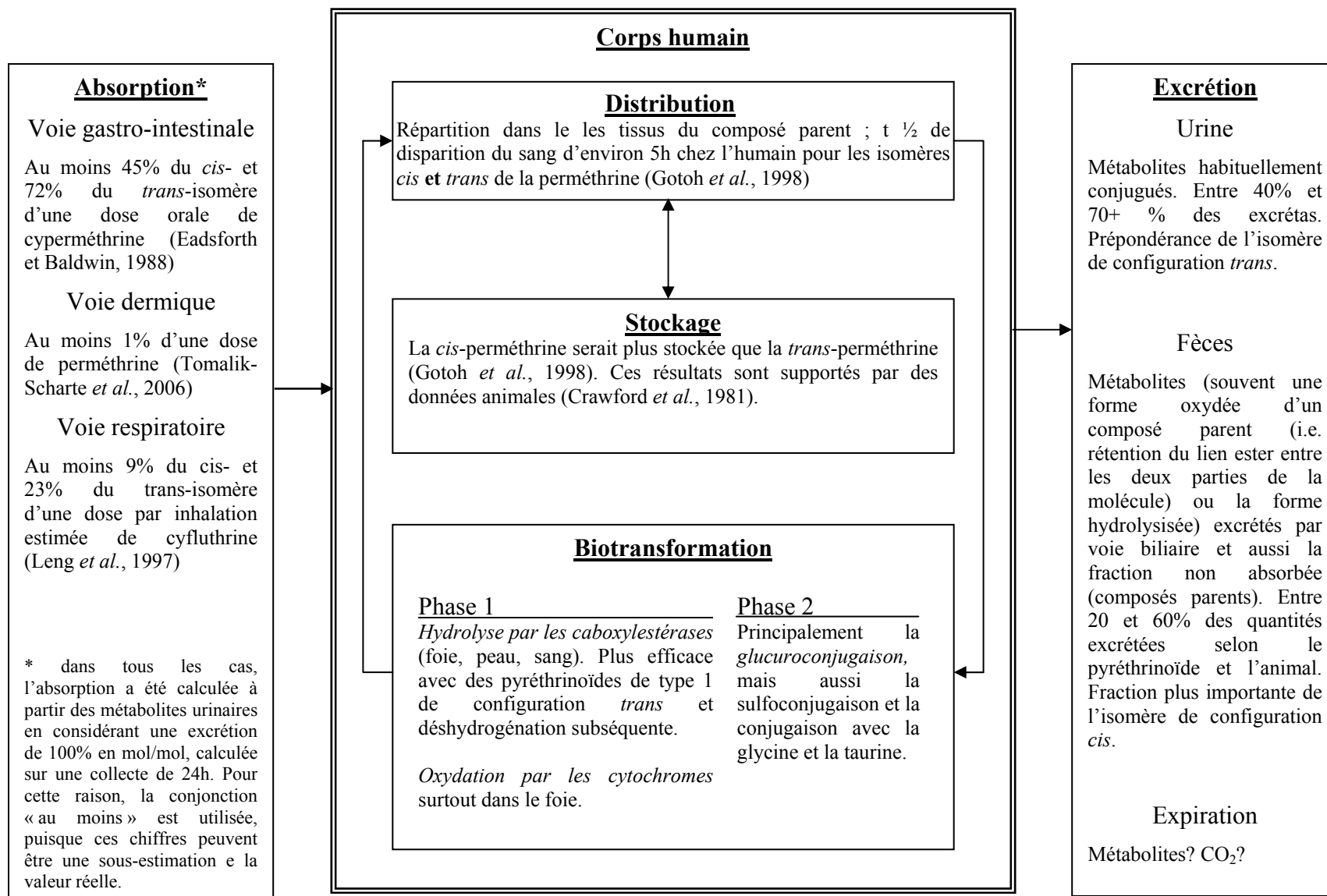
* Données compilées par **INCHEM** (International Panel on Chemical Safety, (IPCS)) supporté par l'OMS ou par l'**Exttoxnet** (Extension Toxicology Network, Pesticides Information Profiles).

Annexe 3. Type d'effets chez les rongeurs et d'autres animaux rapportés pour les pyréthriinoïdes utilisés au Québec

Pyréthriinoïde ou pyréthrine	Types d'effet			Source
	Tératogène (T) et reproductif (R) (in vivo p.o.)	Spécifique à organe ou un système* (in vivo p.o.)	Cancérogène (in vivo p.o.)	
Alléthrine	Rats ØR, ØT @195mkd	Rats ↓pc, ↑foie @75mkd	Rats 2 ans, Øcancer @FD dnr	Exttoxnet
Cyhalothrine-λ ^a	Rats 3G, ØR, ØT @15mkd	Rats ↓pc @12.5mkd	Rats Øcancer @12.5mkd	INCHEM
Cyperméthrine	Rats 3G, ØR, ØT @37,5mkd Rats ØT @70mkd	Rats ↑foie, ↑reins, (-)foie @1500ppm Lapins (-)thymus, foie, poumons, peau, surrénales dnr	Souris (♀), ↑ tumeurs poumons @229mkd Rats Øcancer @75mkd	INCHEM Exttoxnet
Deltaméthrine	Rats 3G ↓pc mère et progéniture dnr Rats ØT @2,5mkd	Rats Ø(-) @50ppm Souris Ø(-) @100ppm Chiens Ø(-) @40ppm	Rats Øcancer @50ppm Souris Øcancer @100ppm Chiens Øcancer @40ppm	INCHEM Exttoxnet
Fenvalérate ^b	Rats 3G, ↓pc @250ppm Femelles gestantes + sensibles (?)	Rats ↓pc @1000ppm Souris ↓pc @250ppm Souris Rats Chiens cristaux @FD dnr	Rats Øcancer @75mkd Souris Øcancer @ faibles doses dnr	INCHEM Exttoxnet
Flucythrinate	Rats 3G, ↓pc, ↓survie @3mkd Rats ØT @3mkd Lapins ØT @60mkd	Chiens 2 ans, ↓pc @7,5mkd Rats 2 ans, ↓pc @6mkd Rats Chiens ↑foie, ↑reins @300ppm.	Rats Øcancer @6mkd Souris Øcancer @6mkd	INCHEM Exttoxnet
Fluvalinate	Rats foetotoxicité @12,5mkd Rats ØT @50mkd Lapins ØT @125mkd	Rats ↑foie, ↑reins, (-)foie dnr	Rats 2 ans, Øcancer @2.5mkd Souris 2 ans, Øcancer @20mkd	Exttoxnet
Perméthrine	Rats 3G, ØR, ØT @100ppm Rats 3G, (-)F3b mais pas F3c @2500ppm	Rats, Souris ↑foie, (-)foie @2500ppm	Souris (♀), ↑ tumeurs poumons @2500ppm Rats Øcancer @2500ppm	INCHEM Exttoxnet
Pyréthrines	Lapins ØR, ØT dnr Autres animaux données insuffisantes	Animaux (-)système nerveux, immunitaire, foie @ FD dnr	Pas de données rapportant des effets	Exttoxnet
Resméthrine	Rats 3G, ↓pc, ↓survie @25mkd Rats (-)squelette @40mkd Lapins ØT @100mkd Souris ØT @50mkd.	Chiens 6 mois, ↑foie @30mkd Rats ↑foie @25mkd, ↑foie, (-)foie @125mkd ↑thyroïde, (-)thyroïde @250mkd	Rats 2 ans, Øcancer @5000ppm Souris 11/ 2 ans, Øcancer @1000ppm	INCHEM Exttoxnet
Tefluthrine	Rats (-)mère @3mkd, (-)squelette @5mkd Rats multiG, ↓pc @12.5mkd Lapins (-)mère @3mkd, ØT @12mkd	Chiens 1 an, toxicité@2mkd Rats 2 ans, ↓pc, toxicité, (-)hémato @1,1mkd Souris 2 ans, (-)utérus, (-)foie @13,5mkd	Souris 2 ans, Øcancer @54,5mkd Rats 2 ans, Øcancer @18,2mkd	USEPA
Tetraméthrine	Rats ØT @1000ppm Rats (-)R @>300ppm, (-) @<1000ppm Lapins ØT @500ppm	Souris 2 ans, ↓glandes pituitaire, ↓parathyroïde, ↓thyroïde @60ppm Rats ↓pc, ↑foie @3000ppm	Rats ↑tumeur testicules @3000ppm	INCHEM

^a Certaines données obtenues pour la cyhalothrine; ^b Certaines données obtenues pour le esfenvalérate. Légende : R = reproduction ; T = tératogène ; p.o. = *per os* ; mkd = mg/kg/d ; ppm = parties par million (mg/kg de nourriture) ; dnr = dose non rapportée ; 3G = trois générations ; pc = poids corporel ; F3b, F3c ; F3 = 3^e génération filiale, b = 2^e portée, c = 3^e portée; ↓ = diminution ; ↑ = hypertrophie ; (-) = effet délétère ; FD = forte doses

Annexe 4. Résumé de la toxicocinétique des pyréthriinoïdes et des pyréthrines chez l'humain



Annexe 5. Spectres infrarouge et de résonance magnétique nucléaire du CDCA

