

Université de Montréal

Étude de la cinétique de biomarqueurs d'exposition à la perméthrine dans des conditions  
d'exposition réelles chez les travailleurs agricoles au Québec

par

Stéphanie Ferland

Département de santé environnementale et santé au travail

Faculté de Médecine

École de santé publique

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de maîtrise (M.Sc.)

en santé environnementale et santé au travail

option recherche

Novembre, 2014

© Stéphanie Ferland, 2014

## Résumé

La perméthrine fait partie de la famille des pyréthrinoïdes qui sont abondamment utilisés en agriculture. Le but de cette étude était d'obtenir des données sur la cinétique des biomarqueurs d'exposition à la perméthrine en condition réelle d'exposition chez les travailleurs agricoles. Douze travailleurs (un applicateur, un superviseur et dix cueilleurs) exposés à la perméthrine dans le cadre de leur emploi ont été recrutés dans une ferme maraichère de la Montérégie (Québec). Ils ont fourni toutes leurs urines sur une période de trois jours suivant le début des travaux dans un champ traité. Les trois principaux métabolites de la perméthrine, l'acide *cis-/trans*-3-(2,2-dichlorovinyle)-2,2-diméthylecyclopropane carboxylique (*cis-/trans*-DCCA) et l'acide 3-phénoxybenzoïque (3-PBA) ont été analysés par chromatographie liquide à ultra-haute performance couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol. Pour l'applicateur, une augmentation progressive des valeurs d'excrétion a été observée avec un pic unique atteint environ 30 h après le début de l'exposition d'une durée de 3,5 h suivi d'une élimination avec une demi-vie de 8 h. Pour le superviseur et l'un des cueilleurs, les profils d'excrétion de *trans*-DCCA et de 3-PBA étaient compatibles avec de multiples entrées dans la zone traitée pendant la période d'échantillonnage accompagné d'une élimination rapide entre les épisodes d'exposition. L'applicateur aurait été exposé indirectement par contact main-bouche, alors que les autres travailleurs auraient été exposés par la voie cutanée. Pour une surveillance biologique adéquate, nous recommandons de mesurer deux biomarqueurs de la perméthrine, soit le *trans*-DCCA et le 3-PBA et de prendre un minimum de trois échantillons urinaires, un avant et deux pendant ou suivant la période d'exposition.

**Mots-clés** : Perméthrine, pyréthrinoïdes, travailleurs agricoles, toxicocinétique, DCCA, 3-PBA

## Abstract

Permethrin is a synthetic pyrethroid insecticide widely used in agriculture worldwide. This study aimed at obtaining data on the time courses of biomarkers of exposure to permethrin in agricultural workers following typical exposure conditions. Twelve workers (an applicator, a supervisor and ten harvesters) exposed to permethrin were recruited from a corn production farm in the Montérégie (Quebec). They provided all their urine voided over a period of three days following the onset of a spraying episode of permethrin or work in a treated area. Three major metabolites of permethrin, *cis-/trans*-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylic acid (*cis-/trans*-DCCA) and 3-phenoxybenzoic acid (3-PBA) were analyzed by ultra-high performance liquid chromatography coupled to quadripole time-of-flight mass spectrometry (UHPLC/Q-TOF MS). For the applicator, a progressive rise in excretion values was observed with a single peak being reached about 30 h following the onset of the 3.5 h exposure and ensuing elimination with a half-life of 8 h. For the supervisor and one harvester excretion profiles of *trans*-DCCA and 3-PBA were more compatible with multiple entries in the treated area during the 3-day sampling period and rapid elimination between exposure episodes. The applicator would have been indirectly exposed by hand-to-mouth contact, while other workers would have been exposed by the dermal route. Time-dependent variability in excretion values of workers confirms the need for serial urine sampling of at least two biomarkers of exposure for routine biomonitoring, with minimally pre-exposure, end-of-shift sample the day of the onset of exposure and following morning void.

**Keywords** : Permethrin, pyrethroids, occupational health, toxicokinetics, DCCA, 3-PBA

# Table des matières

Résumé .....	ii
Abstract.....	iv
Table des matières .....	v
Liste des tableaux .....	vii
Liste des figures .....	viii
Liste des sigles et abréviations.....	ix
Remerciements .....	xii
1. Introduction.....	1
1.1 Pyréthrinoïdes et perméthrine comme molécule type : utilisation, structure et propriétés physico-chimiques.....	1
1.1.1 Utilisation des pyréthrinoïdes et de la perméthrine en particulier .....	1
1.1.2. Structure et propriétés physico-chimiques de la perméthrine .....	4
1.2 Toxicocinétique de la perméthrine.....	6
1.2.1. Voies d'exposition et absorption .....	6
1.2.2 Distribution et métabolisme .....	9
1.2.3. Excrétion.....	13
1.3. Toxicité de la perméthrine .....	15
1.3.1 Effets nocifs .....	15
1.3.2. Toxicité animale .....	16
1.3.3. Toxicité humaine .....	18
1.3.4. Effets synergiques.....	20
1.3.5 Doses de référence .....	21
1.4. Surveillance biologique .....	22
1.4.1. Biomarqueurs urinaires.....	22
1.4.2. Surveillance biologique dans la population générale.....	24
1.4.3. Surveillance biologique chez les travailleurs.....	25
1.5. Problématique.....	27
2. Article .....	29
Contribution des auteurs .....	29
ABSTRACT .....	31

INTRODUCTION .....	33
METHODS .....	37
RESULTS .....	45
DISCUSSION .....	50
REFERENCES .....	59
3. Discussion générale .....	76
3.1. Évaluation de l'approche utilisée .....	76
3.2 Comparaison des données post-exposition avec celles de pré-exposition .....	79
3.3 Comparaison avec d'autres études .....	82
3.4 Inscription de l'étude dans un projet plus vaste .....	87
4. Conclusion .....	92
Bibliographie .....	94

# Liste des tableaux

## Article

<b>Table 1.</b> Personal information on each worker, as documented by self-administered questionnaire .....	64
<b>Table 2.</b> Exposure conditions for each worker during the three-day biomonitoring period, as documented by self-administered questionnaire .....	66
<b>Table 3.</b> Descriptive statistics of the group of workers .....	68
<b>Table 4.</b> Within-subject variability in <i>trans</i> -DCCA and 3-PBA urinary concentration ( $\mu\text{mol}/\text{mol}$ creatinine) over the course of the 3-day biomonitoring period following the onset of exposure to permethrin .....	70
<b>Table 5.</b> Within-subject variability in <i>trans</i> -DCCA and 3-PBA urinary excretion rates ( $\text{pmol h}^{-1} \text{kg}^{-1} \text{bw}$ ) over the course of the 3-day biomonitoring period following the onset of exposure to permethrin .....	72
<b>Table 6.</b> Daily excretion rates of <i>trans</i> -DCCA and 3-PBA in the urine of workers during the three-day biomonitoring period following the onset of an exposure period to permethrin, reconstructed absorbed daily doses and comparison with proposed biological reference values (BRVs) .....	73

## Discussion

<b>Tableau I.</b> Concentrations de <i>trans</i> -DCCA et 3-PBA ( $\mu\text{mol}/\text{mol}$ de créatinine) dans des collectes urinaires pré et post-exposition à la perméthrine .....	80
<b>Tableau II.</b> Comparaison des taux d'excrétion de 3-PBA ( $\text{pmol}/\text{h}/\text{kg pc}$ ) obtenus dans la présente étude avec ceux obtenus dans d'autres études menées dans la Province du Québec .....	83
<b>Tableau III.</b> Concentrations urinaires de 3-PBA ( $\mu\text{g}/\text{g}$ de créatinine) obtenues dans la présente étude comparées à celles obtenues dans plusieurs autres études à travers le monde .....	85

# Liste des figures

## Introduction

**Figure 1.** Structure moléculaire de trois pyréthriinoïdes..... 5

**Figure 2.** Biotransformation de la *trans*-perméthrine..... 12

## Article

**Figure 1.** Time courses of *trans*-DCCA (●) and 3-PBA (Δ) in the urine of workers during the three days biomonitoring period, with values expressed in concentrations ( $\mu\text{mol mol}^{-1}$  creat.; A, C, E) or in excretion rates ( $\text{pmol h}^{-1} \text{kg}^{-1}$  bw; B, D, F). A and B = applicator; C and D = supervisor; E and F = harvester. The exposure periods are indicated for each day (■) ..... 75

## Liste des sigles et abréviations

% : Pourcentage

°C : Degré Celsius

µg : Microgramme

µmol : Micromole

3-PBA : Acide 3-phénoxybenzoïque

4-F-3PBA : Acide 4-fluoro-3-phénoxybenzoïque

bw : Body weight

CDC : Centers for Disease Control and Prevention

CDCA : Acide chrysanthémumdioïque

CFMP : Acide 3-(2-chloro-3,3,3-trifluoro-prop-1-enyl)-2-hydroxy-méthyl-2-méthyl-cyclopropane carboxylique

*cis*-DBCA : Acide *cis*-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-diméthylcyclopropane-carboxylique

*cis*-DCCA : Acide *cis*-3-(2,2-dichlorovinyle)-2,2-diméthylecyclopropane carboxylique

créat. : Créatinine

CS: Chloréathétose et salivation

DEET : N,N-diéthyl-3-méthylbenzamide

DJA : Dose journalière acceptable (ADI en anglais)

DRf : Dose de référence (RfD en anglais)

ECMS: Enquête Canadienne sur les Mesures de la Santé (CHMS en anglais)

U.S. EPA : U.S. Environmental Protection Agency

EPI : Équipement de protection individuelle

FAO : Food and Agriculture Organization

FPBA : Acide fluorophénoxybenzoïque

g : Gramme

h : Heure

hCE-1 : Enzyme carboxylestérase humaine 1

hCE-2 : Enzyme carboxylestérase humaine 1

JMPR : Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues

Kg : Kilogramme

L : Litre

LD50 : Dose létale 50

LOD : Limit of detection

LOEL : Lowest Observed Effect Level

MAPAQ : Ministère de l'Agriculture, de la pêche et de l'alimentation du Québec

Max : Maximum

MCF-7 : Michigan Cancer Foundation-7

mg : Miligramme

MG : Moyenne géométrique

Min: Minimum

ml : Mililitre

NHANES : National Health and Nutrition Examination Survey

NOEL : No Observed Effect Level

OMS : Organisation Mondiale de la Santé (WHO en anglais)

PBO : Butoxyde de pipéronyle

pc : Poids corporel

pH : Potentiel hydrogène

pmol : Picomole

T : Tremor

*trans*-DCCA : Acide *trans*-3-(2,2-dichlorovinyle)-2,2-diméthylecyclopropane carboxylique

## Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier Michèle pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, pour son soutien et pour tous les conseils avisés qu'elle m'a prodigués tout au long de ma maîtrise. Je me dois aussi de mentionner: Jonathan pour sa précieuse aide sur le terrain et pour la modélisation des données; Ross sans qui j'aurais eu beaucoup de difficulté à faire fonctionner le Q-tof, ainsi que pour son aide en laboratoire et pour la comptabilisation des résultats; Marc qui m'a aidé pour les manipulations en laboratoire et Roberto grâce à qui j'ai pu communiquer avec les participants hispanophones. Un grand merci sincère à Mylène et Igor qui ont répondu avec patience à toutes mes questions. Je tiens aussi à remercier Marjory, Richard, Axelle, Ginette, Sandra, Denis et Sara pour leur support moral et leur bonne conversation.

Évidemment, je dois aussi remercier l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en Sécurité du travail (IRSST) pour m'avoir octroyé une bourse qui m'a permis de me concentrer sur mes études. De plus, je tiens à remercier Rosdev pour la bourse d'excellence, la Faculté de Médecine de l'Université de Montréal pour la bourse de recrutement et le département de Santé environnementale et santé au travail pour les bourses de soutien.

Pour terminer, je tiens à remercier ma famille pour m'avoir encouragé, soutenu et nourri durant toutes mes années d'études. Je veux aussi remercier mon copain qui m'a écouté avec attention me plaindre contre tout ce qui ne fonctionnait pas aussi bien que je le voulais.

# **1. Introduction**

## **1.1 Pyréthriinoïdes et perméthrine comme molécule type : utilisation, structure et propriétés physico-chimiques**

Les pyréthriinoïdes sont une famille d'insecticides synthétiques largement utilisés en agriculture (Gorse et Balg, 2014). Ils sont dérivés des pyréthrines qui elles, sont extraites de fleurs de chrysanthème (Klaassen, 2001). Ces insecticides naturels se dégradant trop rapidement, des molécules dérivées ont été synthétisées et des groupements halogénés ont été ajoutés afin de les rendre plus persistants dans l'environnement (Casida, 1980). La perméthrine est l'un des premiers insecticides de la famille des pyréthriinoïdes à être utilisé en agriculture étant donné sa meilleure résistance à la photodégradation (Casida, 1980). Dans les prochaines lignes, l'utilisation, la structure et les propriétés physico-chimiques des pyréthriinoïdes et en particulier de la perméthrine seront décrites.

### **1.1.1 Utilisation des pyréthriinoïdes et de la perméthrine en particulier**

Au Québec, le secteur bioalimentaire est une industrie essentielle comptabilisant jusqu'à 475 000 travailleurs. De cela, 12% des employés travaillent en agriculture. (MAPAQ, 2012) Ils sont répartis dans trois secteurs primordiaux, soit l'horticulture, l'élevage et la production de céréales. Le secteur de l'horticulture comprend environ 30% de travailleurs agricoles et inclut notamment la culture maraîchère.

De nombreux insectes comme les vers-gris, les pyrales et les légionnaires d'automne attaquent les champs de culture et ravagent les récoltes (PMRA, 2008). Pour contrer cette menace, les travailleurs agricoles doivent trouver des solutions. Le plus souvent, ils se tournent vers des insecticides (Aktar *et al.*, 2009). Durant un bon nombre d'années, les insecticides organophosphorés étaient largement utilisés. Toutefois, Santé Canada (2007) a réévalué les risques associés à ces molécules et leur utilisation est devenue de plus en plus restreinte en milieu agricole. Ceci a eu comme résultat d'augmenter l'utilisation d'autres insecticides. Les pyréthrinoïdes étant considérés comme moins dangereux sont de plus en plus utilisés par les travailleurs (Gorse et Balg, 2014).

Parmi les pyréthrinoïdes largement utilisés, on retrouve la perméthrine (Gorse et Balg, 2014). Cette dernière est utilisée abondamment en milieu agricole pour le contrôle d'une large variété d'insectes adultes, dont les puces, les tiques, les cafards, les moustiques, les vers-gris et les punaises (PMRA, 2008). De plus, aux États-Unis, la perméthrine a été approuvée par le *U.S. Environmental Protection Agency* (U.S. EPA) pour une utilisation en agriculture et en foresterie, ainsi que pour une utilisation résidentielle (U.S.EPA, 2009).

Des résidus de perméthrine ont été mesurés dans l'alimentation de la population générale (Heudorf et Angerer, 2001; Schettgen *et al.*, 2002), et ceci est le reflet de son utilisation en agriculture, dans les serres et sur le bétail. En agriculture, elle est pulvérisée sur une large variété de cultures, dont les tomates, le maïs sucré, le chou et la laitue (PMRA, 2008). De plus, elle peut être appliquée sur les barrières et les bâtiments, mais

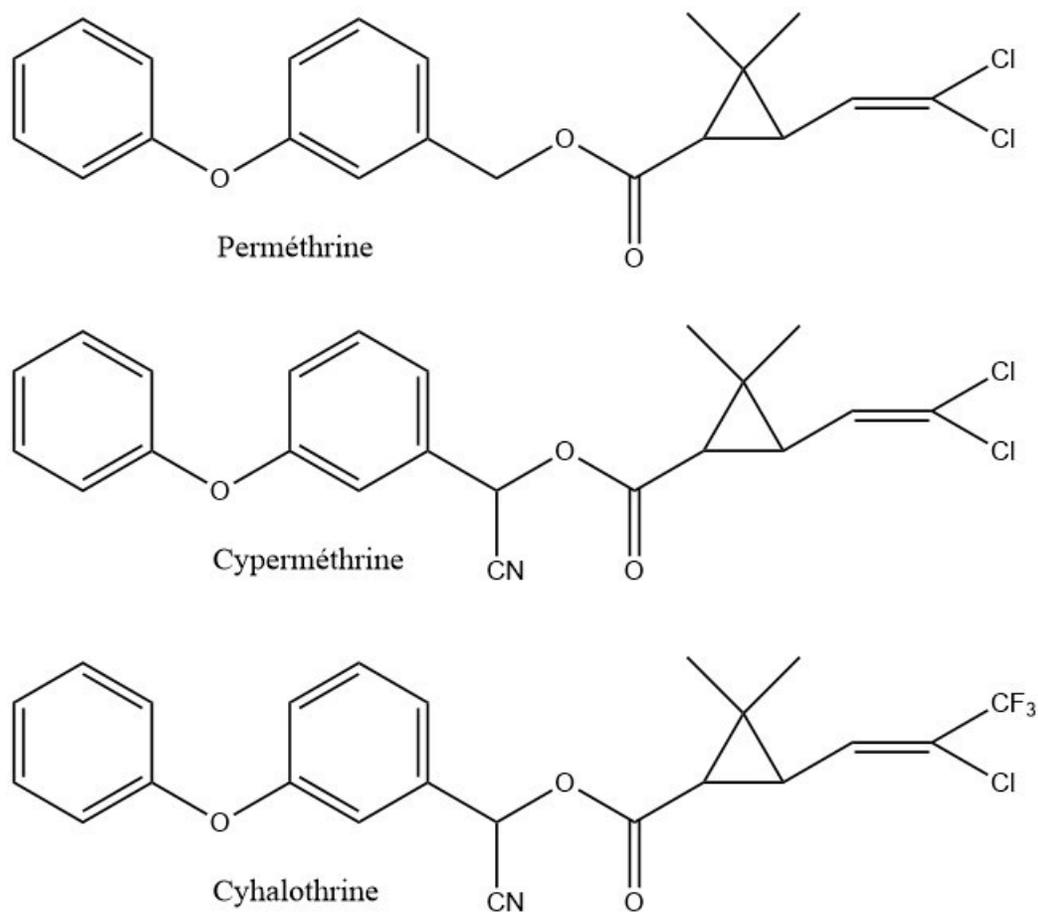
aussi directement sur les animaux. Ainsi, des résidus de perméthrine peuvent être absorbés par les animaux et ensuite passés dans les œufs et le lait (Sassine *et al.*, 2004). Par ailleurs, la perméthrine est aussi utilisée directement sur la peau chez l'humain pour le traitement contre les poux et la gale (Kolaczinski et Curtis, 2004).

De plus, comme la perméthrine s'adsorbe relativement facilement dans les tapis et les tissus, elle peut être incorporée lors de leur fabrication afin de prévenir leur dégradation par des insectes (Morgan *et al.*, 2007). Dans les pays où la malaria est endémique, l'utilisation de filets traités avec des insecticides (dont la perméthrine) est recommandée par les Agences de santé publique (Kolaczinski et Curtis, 2004). Afin de protéger les militaires contre les piqûres d'insectes qui sont vecteurs de nombreuses maladies endémiques comme la maladie de Lyme, la fièvre pourprée des montagnes Rocheuses ou l'encéphalite virale, les uniformes de batailles américains ont aussi été faits à partir de tissus imprégnés de perméthrine (NRC, 1994). L'utilisation de ces uniformes a permis de réduire considérablement le taux d'infection, surtout chez le personnel militaire effectuant des missions outre-mer (NRC, 1994). Lors de la guerre du Vietnam, les morsures d'insectes seraient responsables de plus du double de morts que les combats (NRC, 1994). Différentes formulations de perméthrine existent. Elles peuvent être sous forme de poudre mouillable, de concentré émulsifiable, de produit pressurisé, de diffuseur de vapeur et de granules (Ministère de l'Environnement, 2002).

### 1.1.2. Structure et propriétés physico-chimiques de la perméthrine

La perméthrine ou 3-phénoxybenzyl (1RS,3RS;1RS,3SR)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-diméthylcyclopropanecarboxylate ( $C_{21}H_{20}Cl_2O_3$ ) porte divers noms commerciaux, dont Ambush, Coopex, Prelude, Dragnet et Pounce (Ministère de l'Environnement, 2002). La perméthrine comprend une moitié phénoxybenzoïque, et une moitié cyclopropane carboxylique. Elle fait partie des pyréthrinoïdes de type I puisqu'elle n'a pas de groupement nitrile (Soderlund *et al.*, 2002). La perméthrine comprend deux carbones chiraux au niveau de son anneau cyclopropane et il existe un total de 4 stéréoisomères. Il est facile de séparer la paire d'isomères *cis* de celle d'isomères *trans*, alors qu'une technique de séparation chirale est requise pour distinguer les deux isomères *cis* ou les deux isomères *trans* (WHO, 2009).

Le poids moléculaire de la perméthrine est de 391,3 g/mol. À température ambiante, elle se retrouve sous forme d'un liquide visqueux de couleur jaune-brun pâle (Kaneko et Miyamoto, 2001). À cette même température, elle a tendance à former quelques cristaux. Sa masse volumique varie entre 1,19 et 1,27 g/mL. Toujours à 20°C, son coefficient de partage octanol : eau est de 6,1. La perméthrine a une plus grande solubilité dans les solvants organiques comme le propylène glycol ou le diméthylsulfoxyde que dans l'eau. Elle est plus stable dans une solution légèrement acide, avec une stabilité optimale à pH 4. Elle ne se détériore pas à la chaleur. C'est un liquide combustible qui brûle avec difficulté (Ministère de l'Environnement, 2002).



**Figure 1 : Structure moléculaire de trois pyrétthinoïdes**

La perméthrine a une très faible pression de vapeur et une très grande facilité à s'adsorber sur des matériaux comme les poussières ou les tissus (Berger-Preiss *et al.*, 2002). Sa persistance dans l'environnement varie en partie selon son exposition aux rayons ultraviolets. Donc, elle aura un temps de demi-vie environnementale beaucoup plus élevé à l'intérieur qu'à l'extérieur (Kolaczinski et Curtis, 2004). Dans le sol, la perméthrine a un temps de demi-vie qui varie entre 28 et 38 jours, ce qui est assez court pour éviter une accumulation notable (Kaufman *et al.*, 1977). La présence de microorganismes capable de décomposer la perméthrine en brisant le lien ester diminue

le temps de demi-vie (Kaufman *et al.*, 1977). Puisque ces microorganismes se retrouvent en majorité dans la matière organique, la dégradation de la perméthrine se fait plus rapidement lorsqu'elle se retrouve sur des végétaux plutôt qu'à l'intérieur du sol (Doyle *et al.*, 1981). Dans ce cas, son temps de demi-vie est autour de dix jours. Dans l'eau, sa dégradation a lieu encore plus rapidement dû aux rayons ultraviolets (Sharom et Solomon, 1981). Par contre, la perméthrine peut s'adsorber sur les sédiments composés de matières organiques et elle peut aussi s'accumuler chez certains poissons comme le Piméphales promelas (Holcombe *et al.*, 1982).

## **1.2 Toxicocinétique de la perméthrine**

La toxicocinétique consiste à décrire, dans le temps, le devenir de substances toxiques dans un organisme. Quatre processus permettent de dépeindre ce passage dans le corps, soit l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion.

### **1.2.1. Voies d'exposition et absorption**

Les voies d'absorption de la perméthrine sont multiples allant de la voie respiratoire, à la voie cutanée en passant par le système digestif. L'importance de chacune des voies d'absorption varie selon l'exposition de chacun. La perméthrine est peu volatile, mais elle est lipophile.

Dans la population générale, les principales voies d'exposition sont l'alimentation et le contact cutané (Julien *et al.*, 2008; Riederer *et al.*, 2011; Schettgen *et al.*, 2002).

L'étude de Morgan et al (2007) a montré la présence de perméthrine dans les maisons et dans les garderies. Les résidus se retrouvaient surtout dans la poussière résidentielle et sur les surfaces dures. Des résidus de pesticides ont par ailleurs été mesurés dans plusieurs aliments provenant de déjeuners d'enfants, par contre aucune présence de perméthrine n'a été détectée dans des échantillons d'aliments liquides (Morgan *et al.*, 2007). Cependant, des études ont montré la présence de perméthrine non métabolisée dans le lait des vaches (Sassine *et al.*, 2004). Les résidus se trouvaient presque exclusivement dans la phase lipidique. Il est à noter que des études ont montré que l'isomère *cis* s'accumule davantage dans le lait maternel que l'isomère *trans* (Sassine *et al.*, 2004). La perméthrine se retrouve aussi dans les aliments tels que les céréales, les fruits et les légumes provenant de champs traités (ACIA, 2005). Pour la population générale, l'absorption par la voie cutanée se fait surtout lors d'utilisation de shampoing contre les poux ou la gale, de vaporisateurs insectifuges ou lors de contact avec une surface traitée (Tomalik-Scharte *et al.*, 2005).

Chez les travailleurs, dans le cadre de leur fonction, les données de la littérature suggèrent que les principales voies d'expositions sont celles cutanées et pulmonaires (Vermeulen *et al.*, 2002). De plus, il faut ajouter l'ingestion qui se produit lorsqu'ils s'alimentent. La voie cutanée est favorisée pour les travailleurs qui entrent en contact direct avec les plantes traitées à la perméthrine (Vermeulen *et al.*, 2002). La voie respiratoire serait plus importante lors de l'épandage et de travaux dans un milieu fermé (Bradberry *et al.*, 2005). En moyenne, selon Vermeulen *et al.* (2002), chez les travailleurs, la voie cutanée représenterait 90% de l'exposition et les 10% restant seraient attribuables à la voie pulmonaire. La plupart des travailleurs sont affectés à des tâches

dans les champs et seul un nombre restreint effectue des applications au sein d'une ferme favorisant dans ce dernier cas une exposition respiratoire (Arcury *et al.*, 2006).

En termes de fraction d'absorption, suite à une exposition orale, entre 3 et 6 % de la perméthrine a été retrouvée intacte dans les fèces, ce qui suggère que cette fraction n'a pas été absorbée (Gaughan *et al.*, 1976). Anadon *et al.* (1991) ont rapporté qu'environ 60 % de la dose initiale de perméthrine étaient biodisponibles dans le corps. Pour faire ce calcul, ils ont comparé la quantité de perméthrine dans le sang suite à une injection intraveineuse et suite à un gavage. La fraction biodisponible pourrait être sous-estimée, puisqu'une partie de la perméthrine étant absorbée par le système digestif pourrait subir l'effet de premier passage hépatique (Anadon *et al.*, 1991). Un pourcentage d'absorption de 70 % chez le rat est considéré comme une valeur suffisamment conservative par la plupart des chercheurs (Anadon *et al.*, 1991; CEPA, 1992; Gaughan *et al.*, 1976).

Au niveau cutané, il a été documenté que seule une faible fraction de la dose de perméthrine passait vers la circulation sanguine. Dans l'étude de Tomalik-Scharte *et al.* (2005), la plupart des sujets n'absorbait pas plus de 0.5% de la dose initiale, tel qu'estimé sur la base des niveaux de métabolites urinaires observés. Par contre, d'autres études ont estimé la dose absorbée à 2% (Formoli, 1992). L'absorption au travers de la peau est également assez lente, même que selon Tomalik-Scharte *et al.* (2005) la perméthrine est plus rapidement métabolisée qu'elle n'est absorbée par la peau. Donc, suite à une absorption cutanée, l'absorption systémique est très faible. Le fait que l'absorption se fasse aussi lentement peut empêcher le retour rapide à un niveau de base, puisqu'il y a

une absorption continue de pyréthriinoïdes (Tomalik-Scharte *et al.*, 2005). Une étude chez le rat a montré une diminution de l'absorption de perméthrine par la peau lorsque la dose appliquée augmentait (Shah *et al.*, 1987). L'étude de Sidon *et al.* (1988) sur les rats et les singes rhésus a aussi montré que l'absorption cutanée variait selon la zone du corps exposée. Par exemple, chez le singe, le front absorbe entre 10 et 20 % plus de perméthrine que l'avant-bras. Cela s'explique par le fait que la peau du front est plus lisse et plus dépourvue de poil chez le singe (Sidon *et al.*, 1988).

Selon Leng *et al.* (2003), à partir du ratio d'isomère de l'acide 3-(2,2-dichlorovinyle)-2,2-diméthylecyclopropane carboxylique (DCCA) dans l'urine, il est possible de déterminer si la voie d'exposition est cutanée ou bien respiratoire ou orale. Suite à une exposition cutanée, il a été rapporté que le ratio *trans/cis* était inférieur à 1, alors que suite à une ingestion, le ratio était supérieur à 1. Cependant, il faut prendre en compte le fait que, dans les formulations commerciales, les ratios d'isomères varient considérablement d'une compagnie à l'autre (Tomalik-Scharte *et al.*, 2005). En connaissant le ratio de la formulation de perméthrine utilisée, il est possible de déterminer le ratio d'isomères dans l'urine pour chacune des voies d'exposition. En comparant ce ratio théorique avec le ratio obtenu, il a été suggéré que l'importance relative de chacune des voies à l'exposition totale pourrait être calculée (Leng *et al.*, 2003).

### **1.2.2 Distribution et métabolisme**

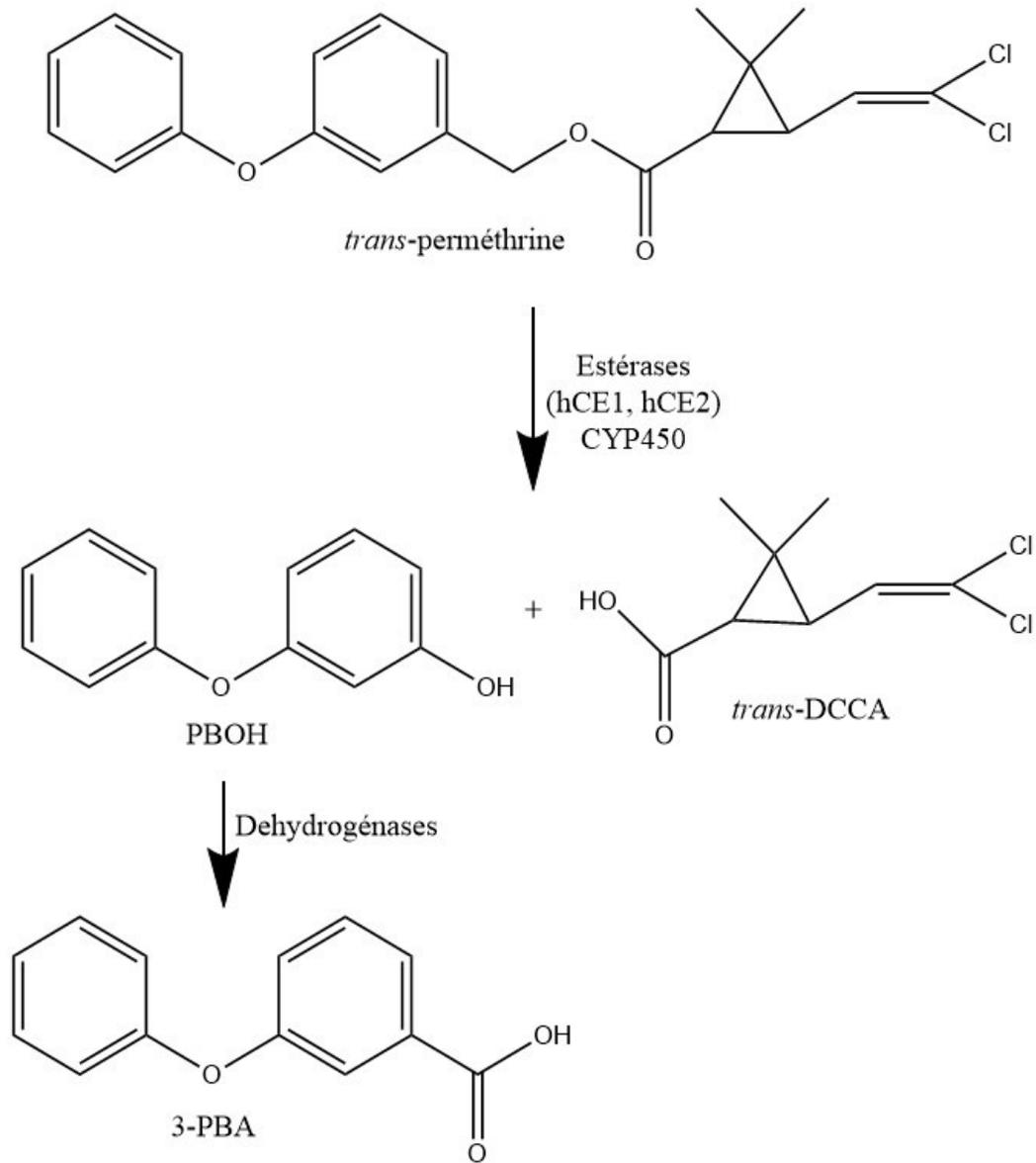
Selon les données animales disponibles, les tissus en général ne montrent pas de stockage prolongé (jours et plus) des métabolites de la perméthrine, cependant, l'isomère

*cis* aurait tendance à s'accumuler davantage dans les tissus adipeux que l'isomère *trans* (Anadon *et al.*, 1991; Kaneko et Miyamoto, 2001). Tornero-Velez *et al.* (2012) ont déterminé chez le rat des temps de demi-vie d'élimination différents selon les tissus. Ils ont obtenu un temps de demi-vie de 5 à 56 h pour les tissus adipeux, de 1 à 5 h pour le cerveau et de moins d'une heure pour le foie. Le temps de demi-vie dans le sang était semblable à celui du foie. Le tissu adipeux avait la plus grande concentration de perméthrine, alors que le foie avait la concentration la plus faible. Anadon *et al.* (1991) ont déterminé que les concentrations de perméthrine sont plus élevées dans le cerveau et les tissus nerveux que dans le sang. Cela pourrait s'expliquer par la grande solubilité de la perméthrine dans les lipides. Ils ont calculé un temps de demi-vie apparente de la perméthrine de 16 à 24 h dans l'hippocampe, le bulbe rachidien et le nerf sciatique comparé à un temps de demi-vie apparente de 12 h dans le plasma (Anadon *et al.*, 1991).

La biotransformation est l'une des plus importantes voies de détoxification de la perméthrine, puisque seul le composé mère a des effets toxiques. Aucune interaction nocive n'a été observée pour les métabolites (NRC, 1994). L'une des voies principales du métabolisme des pyréthrinoïdes est l'hydrolyse du lien ester qui mène à la formation d'une partie alcool et d'une partie acide qui subissent par la suite une oxydation et une conjugaison avant d'être éliminées dans l'urine (Hutson, 1979). La vitesse de métabolisme et la nature des métabolites varient selon les organismes vivants (Kolaczinski et Curtis, 2004). Lors de l'hydrolyse du lien ester, la perméthrine est scindée et mène à la formation de deux métabolites majeurs, soit l'acide 3-phénoxybenzoïque (3-PBA) et l'acide 3-(2,2-dichlorovinyle)-2,2-diméthylecyclopropane carboxylique (DCCA) (Kaneko, 2011). Deux

isomères importants de la perméthrine se retrouvent dans les formulations commerciales, soit la *trans*- et la *cis*-perméthrine dont la biotransformation génère respectivement le *trans*- et le *cis*-DCCA. (Morgan *et al.*, 2007) L'hydrolyse se fait par deux types de carboxylestérases dans le foie humain, soit les hCE-1 et hCE-2 (Ross *et al.*, 2006). La seconde enzyme hydrolyse les pyréthriinoïdes à un rythme deux fois plus rapide que la première (Nishi *et al.*, 2006). Chez les mammifères, les carboxylestérases ont une plus grande affinité pour l'isomère *trans*. En effet, l'enzyme hCE-1 hydrolyse l'isomère *trans* 12 fois plus vite que sa contrepartie *cis*, alors que hCE-2 l'hydrolyse 5 fois plus rapidement (Nishi *et al.*, 2006). Pour ce qui est de l'oxydation par les cytochromes P450, elle se fait en position *cis* ou *trans* du groupement *gem*-diméthyl pour la partie acide, tandis que pour la partie alcool, elle se fait sur les carbones en position 2' et 4' (Scollon *et al.*, 2009).

Une fois oxydés, les différents métabolites peuvent se conjuguer avec l'acide glucuronique, l'acide sulfurique ou la glycine (Kaneko et Miyamoto, 2001). Les métabolites auront tendance à se conjuguer avec différentes molécules. Le 3-PBA se conjugue davantage avec l'acide sulfurique et l'acide glucuronique, alors que le DCCA se conjugue plus avec l'acide glucuronique (Gaughan *et al.*, 1976). Certains résidus de perméthrine qui n'ont pas subi d'hydrolyse peuvent tout de même être oxydés par des enzymes microsomaux hépatiques (Ohshima *et al.*, 1988; WHO, 1990). Cependant, au lieu d'être excrétés dans l'urine, ils passeront par la voie biliaire et seront par la suite éliminés dans les fèces (Gaughan *et al.*, 1976). Ceci s'explique par le poids moléculaire élevé de la perméthrine qui favorise son excrétion par la voie biliaire (NRC, 1994).



**Figure 2 : Biotransformation de la *trans*-perméthrine**

Les pyréthriinoïdes sont métabolisés beaucoup plus rapidement chez les mammifères que chez les insectes ce qui explique en partie la toxicité plus faible chez les mammifères (Bradberry *et al.*, 2005). Au sein même des mammifères, de grandes variations dans la vitesse de métabolisme peuvent être observées (Scollon *et al.*, 2009).

En effet, les microsomes humains biotransforment les pyréthriinoïdes de 5 à 15 fois plus rapidement que ceux des rats, exception faite de la *trans*-perméthrine qui est métabolisée environ 45% plus vite chez l'humain (Scollon *et al.*, 2009). De plus, une variation dans les enzymes hCE-1 et hCE-2 entre les individus peut mener à des degrés de susceptibilités différents. Une abondance réduite de ces estérases peut augmenter la toxicité chez l'humain (Nishi *et al.*, 2006).

### **1.2.3. Excrétion**

La principale voie d'élimination des métabolites les plus importants de la perméthrine, soit le DCCA et le 3-PBA, est l'urine. Selon Kaneko et Miyamoto (2001), l'isomère *cis* de la perméthrine est éliminé autant dans l'urine que dans les fèces chez l'animal, alors que l'isomère *trans* est éliminé à 80% dans l'urine. Cela s'explique par le fait que l'isomère *trans* est beaucoup plus hydrolysé que sa contrepartie *cis*. Seuls les résidus ayant subi une hydrolyse seront éliminés dans l'urine, le poids moléculaire des formes non hydrolysées étant trop important pour favoriser une élimination urinaire (Kaneko et Miyamoto, 2001).

Suite à une exposition aiguë à la cyfluthrine, un pyréthriinoïde de type 2, chez dix travailleurs, la concentration de cyfluthrine a pu être mesurée dans le sang pendant quelques heures, mais cette concentration diminue rapidement ayant un temps de demi-vie entre 0,5 et 2 h (Leng et Lewalter, 1999). Dans une étude, Leng *et al.* (1997a) ont déterminé que la concentration plasmatique de perméthrine descendait sous la limite de détection de 5 µg/L de 4 à 12 h après l'exposition selon les individus. Par contre, la

plupart des métabolites de la perméthrine étaient détectables dans l'urine durant plusieurs jours post-exposition.

Lors d'une absorption cutanée d'une crème contenant 3 g de perméthrine chez des volontaires, les métabolites majeurs de la perméthrine étaient éliminés en une semaine avec un taux maximum d'excrétion atteint dans les premières 24 h. Le temps de demi-vie d'élimination rapporté chez les volontaires sains était de 28.8 h, alors qu'il était de 37.8 h chez des patients ayant de la gale (Tomalik-Scharte *et al.*, 2005). Suite à une exposition cutanée de 31 mg de cyperméthrine chez six volontaires, le temps de demi-vie des métabolites variait de 8 à 22 h. Le pic d'excrétion a été atteint entre 12 et 36 h après le début de l'exposition (Woollen *et al.*, 1992).

Dans une étude chez des volontaires exposés oralement à la perméthrine, Ratelle *et al.* (2014a) ont montré que 84 h après ingestion, l'élimination des métabolites *trans*-DCCA, *cis*-DCCA et 3-PBA dans l'urine était quasi complète. Ils ont calculé des temps de demi-vies d'élimination apparentes similaires pour les trois métabolites. Dans l'urine, les demi-vies d'élimination apparentes moyennes étaient de 5,4 h pour le *trans*-DCCA, de 4,5 h pour le *cis*-DCCA et de 5,7 h pour le 3-PBA. Dans le plasma, les temps de demi-vie étaient du même ordre de grandeur soit de 7,1 h, 6,2 h et 6,5 h respectivement pour le *trans*-DCCA, le *cis*-DCCA et le 3-PBA (Ratelle *et al.*, 2014a).

### **1.3. Toxicité de la perméthrine**

La toxicité regroupe tous les effets néfastes causés par une substance sur un organisme vivant. La sous-section effets nocifs décrit les principaux modes d'action de la perméthrine ainsi que les organes et systèmes à risque. Par la suite, des études de toxicité animales et humaines de la perméthrine sont décrites dans les deux sous-sections suivantes. Ensuite, les effets synergiques de certaines substances sur la perméthrine sont exposés. Pour terminer, les doses de référence de plusieurs organismes sont indiquées.

#### **1.3.1 Effets nocifs**

Les pyréthrinoïdes de type I et de de type II ont des effets nocifs différents sur le système nerveux, par contre, ils agissent tous deux en se liant aux canaux sodium des axones. Le type I, dont fait partie la perméthrine, engendre après chaque dépolarisation de courtes rafales de potentiels d'actions (Kolaczinski et Curtis, 2004). Cela cause un syndrome de type T. Les principaux effets néfastes du type I sont des tremblements de tout le corps, des réactions de sursaut exagérées, de l'hyperexcitabilité et une ataxie (Soderlund *et al.*, 2002). Le type II, quant-à-lui, prolonge l'influx nerveux et augmente le temps de repolarisation de la cellule (Kolaczinski et Curtis, 2004). Il est caractérisé par des mouvements involontaires et de la salivation abondante, nommé syndrome CS (Soderlund *et al.*, 2002).

La perméthrine agit de la même façon sur le système nerveux des insectes que sur celui des mammifères. Cependant, l'impact est beaucoup plus important pour les insectes.

Cela s'explique en partie par le fait que les insectes ont des canaux sodium plus sensibles, ont un plus petit corps et ont une température corporelle plus basse (Bradberry *et al.*, 2005). De plus, la perméthrine est plus rapidement absorbée, plus lentement biotransformée et a une plus grande affinité pour les sites cibles chez les insectes que chez l'humain (Bradberry *et al.*, 2005).

Les pyréthrinoïdes peuvent aussi causer des effets sur d'autres systèmes. L'étude d'Emara et Draz (2007) a montré qu'une exposition répétée par inhalation chez des rats pouvait induire des effets immunotoxiques sur de multiples sites. Hadnagy *et al.* (2003) ont déterminé que suite à l'utilisation de pyréthrinoïdes, de légères modifications immunologiques ont été observées chez les travailleurs. Divers impacts sur le système endocrinien ont aussi été documentés (Kim *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2010).

L'isomère *cis* est considéré comme plus toxique que l'isomère *trans* (Wallwork *et al.*, 1975; WHO, 2009). L'utilisation de produits contenant un ratio *cis:trans* plus faible serait donc moins dangereux. Par exemple, la toxicité du ratio 80:20 serait plus élevée que celle du ratio 40:60 (Jaggers et Parkinson, 1979; Wallwork *et al.*, 1975).

### **1.3.2. Toxicité animale**

Les études animales sont très importantes puisqu'elles permettent de caractériser le potentiel toxique des substances. Plusieurs études ont été réalisées pour évaluer les concentrations menant à des effets néfastes pour les différentes voies d'exposition. Robinson (1989) a déterminé une LOEL de 2 g/kg pc chez les rats ayant subi une

exposition cutanée aiguë. Les effets néfastes observés étaient une incontinence urinaire, une démarche sur la pointe des pieds et une courbure de la colonne vertébrale vers le haut. Brammer (1989) a observé que des rats exposés par inhalation à une concentration de 2 280 mg/m<sup>3</sup> de perméthrine durant 4 h présentaient une légère paresthésie, une diminution de la vitesse des réflexes et une démarche sur la pointe des pieds. Un NOEL de 24 mg/m<sup>3</sup> a pu être calculé à partir de ces résultats.

Lors de l'administration de la perméthrine, le véhicule utilisé a un impact important sur la toxicité. En effet, la perméthrine, qui est lipophile, est beaucoup plus toxique dans l'huile que dans l'eau. Dans des études ayant été menées chez des rats mâles exposés à une dose orale de perméthrine, la dose létale médiane (LD50) variait beaucoup selon le véhicule utilisé. Lorsque l'eau a été utilisée comme véhicule, Parkinson (1978) a obtenu une LD50 de 2949 mg/kg pc et Sasinovich et Panshina (1987) ont obtenu une LD50 de 1725 mg/kg pc. Une étude a été faite en utilisant le diméthylsulfoxyde (DMSO) comme véhicule; la LD50 obtenue a été de 1500 mg/kg pc (Clark, 1978). L'utilisation de l'huile de maïs comme véhicule a toutefois été associée à une LD50 plus faible, et donc une toxicité plus élevée. En effet, Jaggars et Parkinson (1979) ont obtenu une LD50 de 500 mg/kg pc et Kohda *et al.* (1979) ont obtenu une LD50 de 430 mg/kg pc, ce qui est beaucoup plus faible que les LD50 obtenues dans l'eau.

Plusieurs études subchroniques ont été menées chez différentes espèces d'animaux. Metker *et al.* (1977) ont étudié la toxicité d'une exposition orale répétée sur 14 jours chez des rats Sprague-Dawley. Les rats ayant été exposés à des concentrations

égales ou supérieures à 432 mg/kg pc présentait des tremblements musculaires, alors que les rats ayant reçu 216 mg/kg pc et moins n'ont démontré aucun effet nocif. L'étude de Clapp *et al.* (1977) a montré, chez des rat Wistar exposés oralement à 2 500 mg/kg pc sur 28 jours, une augmentation du poids du foie. Chez les souris, une hypertrophie des hépatocytes centrolobulaires avec une éosinophilie cytoplasmique a été observée suite à des doses de 200 mg/kg pc répétées sur 28 jours (Clapp *et al.*, 1977). Une augmentation significative du poids du foie de chiens Beagle ayant reçu des doses orales de 50 mg/kg pc sur trois mois a été observée (Killeen et Rapp, 1976). En bref, les études subchroniques animales tendent à montrer que la perméthrine aurait des effets nocifs sur le foie et sur le système nerveux.

L'étude de Kim *et al.* (2004) a montré que la perméthrine pouvait aussi agir sur le système endocrinien. Pour ce faire, ils ont administré 10 à 800 mg/kg pc de perméthrine à des rats femelles par voie sous-cutanée pendant trois jours. Ils ont observé une augmentation du poids utérin. Certaines études *in vitro* rapportent des résultats similaires (Go *et al.*, 1999; Tyler *et al.*, 1998; Zou *et al.*, 2002), alors que d'autres montrent des résultats opposés (Garey et Wolff, 1998; Saito *et al.*, 2000). La plupart des experts scientifiques s'entendent sur le fait que la perméthrine pourrait agir sur le système endocrinien (Kim *et al.*, 2004).

### **1.3.3. Toxicité humaine**

Les effets de la perméthrine chez l'animal ont été bien documentés, alors que ceux chez l'humain restent assez peu connus. La plupart des études de toxicité de la

perméthrine chez l'humain réfèrent à des cas d'empoisonnement. Gotoh *et al.* (1998) ont étudié un sujet ayant ingurgité volontairement une solution de perméthrine. Ils ont indiqué qu'il n'a pas souffert de tremblement ni d'ataxie motrice contrairement à ce que les études animales laissaient présager. Un des problèmes avec ces études est qu'il est difficile d'isoler les effets de la perméthrine de ceux causés par les autres composants du mélange ingéré. Lors d'intoxication, il y a aussi une imprécision sur la quantité de perméthrine absorbée. En effet, la quantité bue ne peut pas être déterminée avec précision et une partie notable de cette dernière a pu être rejetée par vomissement ou diarrhée. De plus, ces cas d'empoisonnement ne permettent d'obtenir des données que sur les expositions uniques à fortes doses (Gotoh *et al.*, 1998).

Suite à une exposition cutanée aiguë chez l'humain, une paresthésie réversible et une irritation légère de la peau peuvent se produire au site de contact, de 30 minutes à 24 heures après exposition (Chen *et al.*, 2002). À l'opposé, la plupart des études ont montré très peu, voire aucune irritation de la peau chez les volontaires exposés par la voie cutanée à des crèmes ou des timbres contenant de 0,2 à 0,5% de perméthrine (Farquhar *et al.*, 1981; Tomalik-Scharte *et al.*, 2005).

À partir d'une étude *in vitro* sur des cellules humaines, Chen *et al.* (2002) ont conclu que la perméthrine était le pyréthrianoïde avec le plus grand potentiel oestrogénique. Les pyréthrianoïdes pourraient agir en se liant aux récepteurs oestrogéniques et en favorisant la prolifération cellulaire (Chen *et al.*, 2002). Plus spécifiquement, les pyréthrianoïdes peuvent entraîner une activité oestrogénique et

antiprogestagénique dans les lignées cellulaires MCF-7 du carcinome mammaire humain (Chen *et al.*, 2002).

Par ailleurs, des associations entre l'exposition aux pyréthrinoïdes et des problèmes comportementaux ou de développement chez les enfants ont été rapportées notamment dans deux études épidémiologiques. D'une part, dans une étude épidémiologique transversale chez 779 enfants, Oulhote et Bouchard (2013) ont rapporté une association positive entre la présence du métabolite de pyréthrinoïdes *cis*-DCCA dans l'urine d'enfants et un score élevé au Questionnaire sur les forces et les difficultés (SDQ). Par contre, l'association avec le *trans*-DCCA était non-significative (Oulhote et Bouchard, 2013). Qi *et al.* (2011) ont également observé une association significative entre les niveaux de métabolites urinaires de pyréthrinoïdes chez des femmes enceintes et une diminution des scores au test de dépistage développemental de Denver (DST) chez leurs enfants à l'âge de 1 an.

#### **1.3.4. Effets synergiques**

Le butoxyde de pipéronyle (PBO) a une grande action synergique sur les pyréthrinoïdes (Casida *et al.*, 1976). Même s'il n'a aucune action insecticide en soi, il est classé comme pesticide par le *U.S. Environmental Protection Agency* (U.S.EPA, 2006). En effet, il agit comme inhibiteur des oxydases à fonction mixtes, ce qui a comme résultat d'augmenter la toxicité de tous les pyréthrinoïdes en particulier chez les insectes (Casida *et al.*, 1976).

Par ailleurs, le DEET a comme propriété de faciliter le passage de plusieurs substances chimiques à travers la peau. Ainsi, la co-exposition de la perméthrine avec le DEET pourrait faciliter son passage à travers la barrière cutanée, ce qui aurait comme résultat d'augmenter la dose absorbée (Dorman, 1990). Une étude a été conduite par l'armée américaine sur la potentialisation de la perméthrine par une co-exposition avec du DEET (Nelson, 1989). Ils ont obtenu une augmentation de la toxicité de 25 à 40% du mélange comparé à chacun des composés seuls. Cependant, le mélange a été administré oralement, alors que le DEET est habituellement appliqué sur la peau. Pour la sécurité des gens exposés, il est important de prendre en compte l'interaction entre les deux substances lors de l'évaluation du risque (Nelson, 1989).

Dans des expériences *in vitro* et *in vivo*, il a été montré que l'hydrolyse de la perméthrine est inhibée par des agents dialkylphosphorylants, tels que les pesticides organophosphorés (Hutson, 1979). Cela peut avoir comme effet de prolonger la présence de perméthrine inchangée dans le sang et donc dans les tissus cibles et ainsi d'augmenter le risque d'effets néfastes (NRC, 1994).

### **1.3.5 Doses de référence**

Selon le Comité conjoint FAO/OMS sur les résidus de pesticides (JMPR), la dose de référence aiguë serait de 1.5 mg de perméthrine/kg de poids corporel (JMPR, 2002). Selon le JMPR (1987), la dose journalière acceptable chez l'humain a été établie à 0-0.05 mg/kg de poids corporel. Par contre, le U.S. EPA propose une dose de référence de 0.25 mg/kg de poids corporel/jour (U.S.EPA, 2009). Selon la classification du risque par

l'OMS, la perméthrine a été classée dans le groupe II qui comprend les composés modérément dangereux (JMPR, 2002).

#### **1.4. Surveillance biologique**

Il y a deux principales méthodes pour estimer l'exposition de travailleurs à une substance chimique. La première méthode consiste à mesurer les concentrations de la substance dans l'environnement du poste de travail, alors que la seconde consiste à mesurer la substance chimique dans le corps du travailleur à l'aide de biomarqueurs (Barr *et al.*, 2006). L'avantage de la première méthode est de documenter les différentes voies d'exposition et de pouvoir relier l'exposition avec une tâche en particulier. Son principal désavantage est que l'exposition externe ne reflète souvent pas la dose réelle absorbée. En effet, cette méthode ne permet pas de déterminer la fraction absorbée ni la vitesse d'absorption, de distribution et d'excrétion (Barr *et al.*, 2006). À l'opposé, la deuxième méthode prend en compte ces différents paramètres, ce qui permet d'obtenir une mesure plus représentative de la dose absorbée. Ainsi, pour étudier l'exposition des travailleurs aux pesticides, la surveillance biologique est à privilégier (Barr *et al.*, 2006).

##### **1.4.1. Biomarqueurs urinaires**

Un biomarqueur d'exposition est une molécule chimique ou un métabolite mesuré dans une matrice biologique afin de déterminer le niveau d'exposition à une substance chimique en particulier (Barr *et al.*, 2006). Les niveaux de biomarqueurs reflètent la contribution de toutes les voies d'exposition, puisqu'ils sont mesurés après l'absorption de

la substance chimique dans le corps. En connaissant la toxicocinétique de la molécule chimique, il est possible de reconstruire les doses absorbées en partant des concentrations ou des quantités excrétées de biomarqueurs (Barr *et al.*, 2006; Bouchard *et al.*, 2008; Bouchard *et al.*, 2006; Bouchard *et al.*, 2003).

Le choix de la matrice et du biomarqueur est important pour une surveillance biologique adéquate. Les pesticides non-persistants comme la perméthrine sont métabolisés rapidement et leurs métabolites sont éliminés en très grande partie dans l'urine (Barr *et al.*, 2006). De plus, selon Leng *et al.* (2003), la concentration de perméthrine dans le sang est inférieure à la concentration de ses métabolites dans l'urine. Au niveau analytique, il serait donc plus aisé d'utiliser l'urine comme matrice, puisque le risque d'avoir des valeurs sous la limite de détection de l'appareil est plus faible (Arcury *et al.*, 2006). Par contre, un désavantage de l'urine est que son volume n'est pas constant, contrairement au sang. Cependant, la normalisation à la créatinine et la collecte d'urine sur 24 heures permettent de pallier en partie à ce problème (Barr *et al.*, 2006). Comparée au sang, l'urine est plus facilement accessible et ne demande pas de personnel spécifique qualifié. De plus, son acceptabilité est généralement plus grande dans la population (Smolders *et al.*, 2009). Ainsi, l'utilisation de l'urine comme matrice pour les pesticides non-persistants est recommandée (Barr *et al.*, 2006).

Les trois principaux métabolites de la perméthrine sont le 3-PBA, le *trans*-DCCA et le *cis*-DCCA. Ces trois métabolites sont éliminés dans l'urine et sont utilisés comme biomarqueurs urinaires (CHMS, 2013; Fortin *et al.*, 2008; NHANES, 2009). Ils ont

comme inconvénient de ne pas être spécifiques uniquement à la perméthrine. En effet, la cyperméthrine produit les trois mêmes métabolites majeurs (Woollen *et al.*, 1992). La cyfluthrine partage aussi le *trans*- et *cis*-DCCA comme métabolites, alors que la deltaméthrine et la lambda-cyhalothrine génèrent également le 3-PBA (Leng *et al.*, 2003). Par contre, ces trois dernières molécules forment d'autres métabolites principaux. Si on observe dans l'échantillon la présence d'acide 4-fluoro-3-phénoxybenzoïque (4-F-3PBA), on sait qu'une partie de l'exposition est due à la cyfluthrine (Leng *et al.*, 1996), tandis que l'acide *cis*-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-diméthylcyclopropane-carboxylique (*cis*-DBCA) nous renseigne sur la présence de deltaméthrine (Godin *et al.*, 2006). L'acide 3-(2-chloro-3,3,3-trifluoro-prop-1-enyl)-2-hydroxy-méthyl-2-méthyl-cyclopropane carboxylique (CFMP) indique, quant à elle, la présence de lambda-cyhalothrine (Leng *et al.*, 2003).

#### **1.4.2. Surveillance biologique dans la population générale**

Des enquêtes de surveillance biologique ont été menées dans la population générale de différents pays. Par exemple, il y a l'enquête canadienne sur les mesures de la santé (ECMS 2013) au Canada et le *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) aux États-Unis (CDC, 2009). Ces larges enquêtes regroupent des informations sur l'exposition de la population générale du pays à diverses substances chimiques. Les trois principaux métabolites de la perméthrine en font partie. Ces enquêtes servent de référence pour permettre de comparer les niveaux d'exposition d'un groupe, par exemple les travailleurs, par rapport à la population générale. Cependant, ces enquêtes rapportent seulement des données descriptives et une demande d'accès aux

données par des chercheurs est nécessaire pour analyser des facteurs liés à l'exposition ou cibler des groupes plus à risque.

Des études ciblant certaines populations ont aussi été menées dans différents milieux. Dans le cadre d'une étude menée par notre équipe, Fortin *et al.* (2008) et Couture *et al.* (2009) ont documenté l'exposition d'une population urbaine et d'une population rurale du Québec aux pyréthriinoïdes. La population urbaine visée était celle de la région de Montréal (Fortin *et al.*, 2008), alors que la Montérégie a été ciblée comme région rurale (Couture *et al.*, 2009). Cette dernière est une région fortement agricole du Québec. Six métabolites principaux des pyréthriinoïdes ont été analysés dans les urines, soit le *trans*-DCCA, le *cis*-DCCA, le 3-PBA, le CDCA, le DBCA et le FPBA. Il est ressorti de leurs résultats que la population vivant en milieu rural était plus exposée aux pyréthriinoïdes durant la saison estivale que les individus vivants en région urbaine (Couture *et al.*, 2009). La possibilité de corrélation positive entre les métabolites a également été évaluée. Une très forte corrélation a été observée entre le *trans*-DCCA et le *cis*-DCCA ( $r_s \geq 0.877$ ). Le 3-PBA a aussi été corrélé avec ces deux métabolites, tandis que le CDCA n'a été corrélé avec aucun autre métabolite étudié. En bref, leur étude montre une bonne corrélation entre les trois principaux métabolites de la perméthrine (Couture *et al.*, 2009; Fortin *et al.*, 2008).

### **1.4.3. Surveillance biologique chez les travailleurs**

Les travailleurs étant une population potentiellement plus à risque, plusieurs études sur les pyréthriinoïdes ont ciblé spécifiquement ce groupe d'individus. Ces études

ont été conduites dans plusieurs pays dont le Japon (Wang *et al.*, 2007), l'Allemagne (Hardt et Angerer, 2003; Leng *et al.*, 1996), la Thaïlande (Panuwet *et al.*, 2008) et le Canada (Ratelle *et al.*, 2014a). La plupart de ces études utilisent des données ponctuelles, soit des concentrations de métabolites de pyréthrinoïdes mesurées dans une première urine du matin ou bien dans une collecte d'urine sur 24 h. Ces mictions représentent le niveau d'exposition à un moment précis, mais ne permettent pas de suivre la variation temporelle de la concentration des métabolites. De plus, la majorité des études n'ont pas ciblé un pyréthrinoïde en particulier. Ils ont surtout évalué la concentration du 3-PBA qui est commun à plusieurs pyréthrinoïdes (Hardt et Angerer, 2003; Le Grand *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2007). L'étude de Ratelle *et al.* (2014b) fait figure d'exception. En effet, ils ont récolté toutes les urines sur trois jours et ils ont ciblé uniquement la cyperméthrine et ses trois principaux métabolites.

Dans leur étude, Wang *et al.* (2007) ont comparé le niveau d'exposition de travailleurs japonais entre l'été et l'hiver. Pour ce faire, ils ont quantifié le 3-PBA dans l'urine de travailleurs à deux reprises, une fois à l'été et une fois à l'hiver. Leurs résultats montrent une différence significative dans les concentrations de 3-PBA entre les deux saisons, les valeurs étant plus élevées en été. Ceci est cohérent avec le fait que le nombre d'applications de pesticides est notablement plus élevé en été. De plus, ils ont comparé les concentrations biologiques de travailleurs ayant appliqué de la perméthrine dans les deux jours précédant la collecte avec celles d'individus ayant appliqué plus de deux jours avant la collecte. Ils ont obtenu une différence significative dans les concentrations de 3-PBA entre les deux scénarios d'application, à l'hiver seulement. Les auteurs ont avancé comme

explication que les travailleurs se retrouvent avec un niveau de base constant durant la majeure partie de la saison estivale puisqu'ils appliquent souvent à cette période. À l'opposé, en hiver, les applications étant plus rares, un pic important pourrait être mesuré dans les 48 h suivant l'exposition. Ainsi, durant l'hiver, la concentration de 3-PBA mesurée dans l'urine représenterait l'exposition récente, alors qu'en été, la relation entre l'exposition récente et la concentration urinaire ne pourrait pas être établie aussi clairement (Wang *et al.*, 2007).

## **1.5. Problématique**

La mesure de métabolites dans l'urine est une méthode largement répandue pour la surveillance biologique de l'exposition à des pesticides. C'est pourquoi la quantification des métabolites urinaires de la perméthrine a été proposée pour la surveillance biologique de l'exposition chez les travailleurs. Certaines études ont évalué l'exposition de travailleurs en utilisant des mesures ponctuelles, cependant elles ne permettent pas d'établir de profil cinétique. D'autres études ont utilisé des mesures répétées, mais seulement chez des volontaires ou dans la population générale. Il manque donc de données publiées sur la cinétique détaillée des métabolites de la perméthrine dans des conditions d'exposition réelle chez les travailleurs. Ces données sont nécessaires pour mieux établir les stratégies d'échantillonnage afin d'établir la signification d'une mesure à un moment donné. Cela permettrait de déterminer le moment le plus approprié pour la collecte ponctuelle d'échantillons de routine.

L'hypothèse de recherche sur laquelle se base ce projet est que suite à une exposition professionnelle à la perméthrine en milieu agricole, les niveaux de biomarqueurs urinaires vont varier en fonction du temps, étant donné que les données chez des volontaires exposés aux pyréthrinoïdes dans des conditions contrôlées montrent une absorption et élimination rapide ainsi que des variations selon la voie d'exposition (Ratelle *et al.*, 2014a; Tomalik-Scharte *et al.*, 2005; Woollen *et al.*, 1992). Il sera donc possible de dresser les profils cinétiques qui pourront servir à établir de meilleures stratégies d'échantillonnage en routine. De plus, l'analyse des paramètres cinétiques permettra de retracer les principales voies d'exposition des travailleurs. L'hypothèse est que les travailleurs seront surtout exposés par la voie cutanée lors de leurs travaux dans une zone préalablement traitée.

L'objectif du mémoire était donc d'établir les profils temporels des métabolites majeurs de la perméthrine suivant un épisode d'exposition chez des travailleurs affectés à différentes tâches et d'établir les déterminants de la cinétique.

## 2. Article

### Contribution des auteurs

Stéphanie Ferland : a révisé la documentation pour les participants, effectué le recrutement des participants, organisé la collecte d'échantillons sur le terrain, effectué le traitement des échantillons, entré les données des questionnaires, analysé les données, interprété les résultats, rédigé le manuscrit original et effectué les révisions.

Jonathan Côté : a aidé à recruter les participants et à organiser la collecte d'échantillons sur le terrain, fait la modélisation des données et révisé les analyses statistiques descriptives.

Ross Thuot : a aidé au traitement des échantillons, fait les analyses des métabolites urinaires à l'aide de l'instrument analytique et compilé les données ainsi obtenues.

Michèle Bouchard : a préparé la demande de subvention, développé le devis de l'étude, préparé la demande au comité d'éthique, révisé la documentation pour les participants, supervisé l'analyse des données, contribué à l'interprétation des résultats et révisé le manuscrit original et les révisions subséquentes.

**Detailed Urinary Excretion Time courses of Biomarkers of Exposure to Permethrin  
and Estimated Exposure in Workers of a Corn Production Farm in Quebec, Canada**

Stéphanie Ferland, Jonathan Côté, Ross Thuot and Michèle Bouchard\*

Department of Environmental and Occupational Health, School of Public Health and  
Chair in Toxicological Risk Assessment and Management, Université de Montréal., P.O.  
Box 6128, Main Station, Montreal., Quebec, Canada, H3C 3J7

*\*Corresponding author:*

Michèle Bouchard  
Department of Environmental and Occupational Health  
Université de Montréal  
Roger Gaudry Building, U424  
P.O. Box 6128, Main Station, Montreal, Quebec  
H3C 3J7, CANADA  
Telephone number: +1-514-343-6111 ext 1640  
Fax number: +1-514-343-2200

## ABSTRACT

Permethrin is a synthetic pyrethroid insecticide widely used in agriculture. Farm workers are thus regularly exposed during spraying season. To help interpret routine biomonitoring results, a proper knowledge of the time courses of biomarkers of exposure is necessary. The kinetics of biomarkers of exposure to permethrin have recently been documented in volunteers exposed to permethrin under controlled conditions but there is a lack of detailed time profiles following real exposure conditions. This study aimed at obtaining data on the excretion time courses of permethrin metabolites in agricultural workers following typical exposure conditions in the field. Twelve workers exposed to permethrin were recruited from a corn production farm in the Montérégie, Quebec, Canada. They provided all their urine voided over a period of three days following the onset of a spraying episode of permethrin or work in a treated area. Three major metabolites of permethrin, *trans*-DCCA, *cis*-DCCA and 3-PBA, were analyzed. For the applicator, a progressive rise in excretion values was observed with a single peak being reached 29 h following the onset of the 3.5 h exposure and ensuing elimination with a half-life of 6.4 h for *trans*-DCCA and 8.7 h for 3-PBA. In the other workers (supervisor and corn pickers), excretion profiles were generally more compatible with multiple entries in the treated area during the three-day sampling period and rapid elimination between exposure episodes. In general, 3-PBA was found in slightly higher levels than *trans*-DCCA, except for the applicator and a harvester. For both *trans*-DCCA and 3-PBA in a given worker, excretion values expressed as creatinine-normalized concentrations were less variable than those expressed as excretion rates per kg body weight. Time-dependent variability in excretion values of workers confirms the need for serial urine

sampling of at least two biomarkers of exposure, with minimally pre-exposure, end-of-shift sample the day of onset of exposure and following morning void.

**KEYWORDS:** Pyrethroids; biomonitoring; agricultural workers; permethrin; biomarkers; toxicokinetics

## INTRODUCTION

In Quebec (Canada), agriculture is a key sector with about 60 000 workers (MAPAQ, 2012). Each year, a portion of crops is lost due to insect pests (PMRA, 2008). To counter this threat, farmers use a variety of insecticides (Aktar *et al.*, 2009). Among those, pyrethroids are increasingly used given their relatively low acute toxicity according to animal studies (Cantalamesa, 1993; Gorse et Balg, 2014). These synthetic insecticides are derived from natural pyrethrins, which are extracted from chrysanthemum flowers.

Permethrin is one of the mostly used pyrethroids (Gorse et Balg, 2014). It is categorized as a type I pyrethroid according to its structure and toxicity; it does not contain any cyano group contrary to his cypermethrin pyrethroid homologue (Soderlund *et al.*, 2002). Permethrin may exert neurotoxic effects in both insects and mammals, by acting on action potential of voltage-sensitive sodium channels (Soderlund *et al.*, 2002). However, insects are 2250-fold more sensitive than humans (Bradberry *et al.*, 2005). In addition to permethrin effects on the nervous system, other studies have reported an impact on the immune and endocrine systems (Zhao *et al.*, 2010).

Two major isomers of permethrin are found in commercial permethrin-based insecticidal formulations, the *cis*- and *trans*-forms. The isomer ratio varies from one formulation to another. For instance, Pounce formulation has an average *cis*: *trans* ratio of 40:60, but the percentage of *cis*- may reach 55% and that of *trans*- may be as low as 45% (U.S.EPA, 2012). The *cis* isomer of permethrin is hydrolyzed more slowly and has a higher tendency to accumulate in adipose tissues, favoring its toxicity compared to the *trans* counterpart

(Kaneko et Miyamoto, 2001). Because the toxicity differs according to the isomer form, it is important to account for the *cis:trans* ratio of pyrethroid-based formulations.

Workers may be exposed to permethrin by different routes during spraying or work in treated fields. Direct exposure may occur through the respiratory tract and the skin and inadvertent ingestion is possible (HSE, 2007; Vermeulen *et al.*, 2002). In the general population, the main route of exposure is diet (CHMS, 2013). The route of exposure has a significant influence on absorbed doses and rates. The absorbed dose fraction of permethrin following dermal exposure is estimated at about 0.5% on the basis of an urinary excretion study in volunteers subjected to different applications of permethrin-based cream or shampoos (Tomalik-Scharte *et al.*, 2005), whereas oral absorption fraction has been estimated to be >0.6 up to close to 1 on the basis of mass-balance studies in rats (Anadon *et al.*, 1991; Crawford *et al.*, 1981).

Once absorbed in the animal and human body, metabolism is the primary detoxification pathway, since only the parent compound is thought to induce toxic effects (NRC, 1994). Permethrin undergoes enzymatic hydrolysis of the ester bond, which leads to the formation of metabolites with a benzoic moiety, such as 3-phenoxybenzoic acid (3-PBA), or with the counterpart cyclopropane moiety, including major *trans*- and *cis*- 3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane-1-carboxylic acid metabolites (*trans*- and *cis*-DCCA) (Crow *et al.*, 2007; Kaneko, 2010; Scollon *et al.*, 2009). These metabolites are excreted in urine within a few days following an exposure, mainly conjugated to

glucuronides and sulfates (Kaneko et Miyamoto, 2001; Ratelle *et al.*, 2014a; Tomalik-Scharte *et al.*, 2005).

Measurement of metabolites in urine is used to assess actual exposure of workers and to provide an integrated assessment of exposure through all routes-of-entry. Urine sampling is more easily accessible than blood sampling and it more easily amenable to routine biomonitoring. Furthermore, given the rapid metabolism of permethrin, concentrations of permethrin in blood are more difficult to quantify than those of metabolites in the urine (Barr *et al.*, 2006). Three major metabolites of permethrin usually used for the biomonitoring of exposure to this pyrethroid are 3-PBA, *trans*-DCCA and *cis*-DCCA. Their use is however limited by the fact that they are not specific to permethrin. Cypermethrin generates the same three major metabolites. Cyfluthrin also generates *trans*- and *cis*-DCCA while deltamethrin and lambda-cyhalothrin both form 3-PBA (Leng *et al.*, 2003).

Some biomonitoring studies have been conducted to assess pyrethroid exposure in workers of different countries including Germany, Thailand and Japan (Hardt et Angerer, 2003; Leng *et al.*, 1996; Panuwet *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2007). In Canada, one study has recently been conducted in workers exposed to cypermethrin specifically (Ratelle *et al.*, 2014a). In the general population, various biomonitoring studies have also been carried out such as in France, Canada and the United States (Barr *et al.*, 2010; Fortin *et al.*, 2008; Le Grand *et al.*, 2011). Most of these studies have monitored metabolites in spot urine samples or cumulative excretions over a period of either 12 or 24 h. However,

Barr *et al.* (2006) have questioned this collection method for non-persistent insecticides. They recommend documenting temporal profiles of insecticides in order to better assess actual exposure (Barr *et al.*, 2006).

The aim of this study was to characterize the urinary excretion time courses and variations of key biomarkers of exposure to permethrin under normal exposure conditions in a group of agricultural workers in Quebec, Canada. These data were sought to help interpret routine biological monitoring data based on single or limited repeated sampling.

## **METHODS**

### **Study design and subjects**

During the summer of 2013, workers from a sweet corn farm in Rougemont (Quebec, Canada) were recruited to participate in a biological monitoring study. The workers were exposed to Pounce, a permethrin-containing insecticidal formulation. Twelve workers agreed to participate in the study: ten harvesters, an applicator and a supervisor. The applicator was exposed during mixing/loading and spraying of Pounce as well as cleaning of the equipment. The harvesters were repeatedly exposed during the time spent in the treated fields. The supervisor entered the fields on different occasions to verify the crops and supervise harvest activities. The participants were asked to follow their usual habits during the three days of the study. All participants agreed to sign an informed consent form, which was written in their maternal language. The protocol and the consent form were both approved by the Health Research Ethics Committee of the University of Montreal.

### **Sample and data collection**

For the purpose of the study, participants were invited to provide a complete first-morning void ten days before the beginning of a permethrin exposure to assess baseline levels. They were also asked to provide last urine voided prior to the onset of an exposure episode along with all their urine during the following three-days. They were indicated to collect each void in separate high-density polypropylene Nalgene<sup>®</sup> bottles containing thymol, to prevent bacterial growth. They were also asked to write the day and the time of each void on the bottle label. Due to the short timeframe prior to permethrin spraying,

the applicator was not able to provide a pre-exposure sample ten days before permethrin exposure. Its pre-exposure urine sample corresponded to urine voided just before the onset of mixing/loading/spraying and all urine voided over the next three-day period were collected.

The urine samples were kept in coolers with ice packs in the fields and were picked up on a daily basis, at noon, by a member of our team. They were brought back at the laboratory of the University of Montreal where total urine volume was measured and aliquots were prepared to avoid multiple freezing and thawing of analyzed samples (one 5 ml aliquot in a 15 ml Sarstedt tube and two 90 ml aliquots in 120 ml Sarstedt bottles). The samples were then stored at -20°C until analysis.

The participants were also asked to fill a self-administered questionnaire on each of the sampling days. The questions were written in their maternal language and included personal and work-related information: physical activities, domestic use of pesticide, smoking habits, alcohol consumption, medication, intake of food that may contain pesticide residues, working hours, time spent in a treated area or preparing/mixing/loading/spraying, decontaminating the material, pesticides used on the field prior and during the study period, personal protective equipment, personal hygiene after possible contact or working hours.

## Urinary 3-PBA, *trans*-DCCA and *cis*-DCCA analysis

### *Chemicals and reagents*

Reference standards of a mix of *cis*- and *trans*-DCCA (molecular weight: 209.07 g/mol) and of 3-PBA (molecular weight: 214.22 g/mol) as well as the internal standards  $^{13}\text{C}_2$  1D-*trans*-DCCA and  $^{13}\text{C}_6$ -3-PBA (>99% purity) were purchased from Cambridge Isotope Laboratories Inc. (Andover, MA, USA). MS grade methanol from Honeywell (2.5 l) and HPLC grade methanol from JT Baker (4 l) were both used. HPLC grade acetic acid (A35-500) was obtained from Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada).  $\beta$ -Glucuronidase/arylsulfatase enzyme (100000 Fishman U/ml and 800000 Roy U/ml from Helix pomatia) was obtained from Roche Diagnostics (Laval, Quebec, Canada).

### *Working standards preparation and calibration curves*

Quantification was obtained from standard calibration curves of *trans*-DCCA, *cis*-DCCA and 3-PBA in urinary extracts. Working solutions of 20 nmol ml<sup>-1</sup> of each standard and 1 nmol ml<sup>-1</sup> of the mix of *trans/cis*-DCCA and 3-PBA and of the two internal standards were prepared in methanol. For the calibration curve in urine, blank urine samples (from the same pool of urine) were spiked with different levels of these working standards and underwent the same processing steps as the urine of workers. Calibration points were 0, 25, 50, 100, 200, 350 and 500 pmol ml<sup>-1</sup> of methanolic extract for *trans*-DCCA and 3-PBA and 0, 7, 14, 29, 57, 100 and 143 pmol ml<sup>-1</sup> for *cis*-DCCA. The internal standard concentration was set at 200 pmol ml<sup>-1</sup> of methanolic extract. The stability of working standards in methanol kept at -20°C was about one month and the stability of standards in urine kept at -20°C was more than 3 months.

#### *Extraction of cis and trans-DCCA and 3-PBA in urine*

Aliquots of 5 ml of worker urine were spiked with 100 µl of internal standard mix of  $^{13}\text{C}_2$  1D *trans*-DCCA and  $^{13}\text{C}_6$ -3-PBA at a concentration of 1 nmol/ml. 5 ml of acetate buffer (0.1 M) were added and urine samples were subjected to 16 h overnight enzymatic hydrolysis with 12.5 µl of  $\beta$ -glucuronidase/arylsulfatase at 37°C prior to a solid phase extraction (SPE) using Sep-Pak C18 cartridges (Waters, Milford, MA, USA). The cartridges were first conditioned with 4 ml of methanol, followed by 8 ml of water; the urines were passed through the column and discarded; the cartridges were washed with 8 ml of water; analytes were then eluted from the column with 8 ml of methanol into 10 ml glass tubes. The solvent was evaporated to dryness under a gentle nitrogen stream at 35°C. The residues were resuspended in 1 ml of methanol, centrifuged for 60 s at 3000 rpm and transferred to vials for analysis by ultra-high performance liquid chromatography coupled to quadripole time-of-flight mass spectrometry (UHPLC/Q-ToF MS).

#### *UHPLC/Q-ToF-MS analysis of cis-DCCA, trans-DCCA and 3-PBA in urinary extracts*

Analysis of *cis*-DCCA, *trans*-DCCA and 3-PBA was performed using an Agilent Model 1290 Ultra-High Performance Liquid Chromatography system (UHPLC) equipped with a binary pump and thermostated column compartment (Agilent, Mississauga, Canada) connected to an Agilent model 1290 autosampler (Agilent, Mississauga, Canada) and coupled to a Model 6530 quadripole time-of-flight mass spectrometer (Agilent, Mississauga, Canada) with Dual-Jet-Stream Electrospray Ionization (Dual AJS ESI)

source. The source was operated in the negative ion mode and the specific ESI-UHPLC-MS parameters were all manually optimized.

The compounds were separated using a C<sub>18</sub> Zorbax Eclipse Plus column (2.1 x 50 mm; 1.8 µm, HD) from Agilent (Mississauga, Canada). The temperature of the column was maintained at 40°C. The mobile phase consisted of: eluent A composed of water and 0.01% acetic acid, and eluent B of methanol and 0.01% acetic acid. For analysis, elution was performed in 11 min using a solvent gradient, at a flow rate of 0.4 ml min<sup>-1</sup>. The following solvent program was used: i) 2% eluent B for 2 min, ii) linear gradient to 30% eluent B from 2 to 2.5 min, iii) maintained at 30% eluent B from 2.5 to 3.5 min, iv) increased to 55% eluent B from 3.5 to 4 min and then v) to 60% eluent B from 4 to 7.5 min, vi) linear gradient to 98% eluent B from 7.5 to 8 min, vii) maintained at 98% eluent B from 8 to 9.5 min, and viii) returned to initial conditions of 2% eluent B in 1.5 min. The LC flow was sent to waste before 4 min and then switched to MS to prevent ion suppression by salts contained in matrices. All the analytical compounds eluted between 6.6 to 7.0 minutes. The samples were kept at 5°C on the injection tray and 5 µl were injected.

The exact masses of the analytes were determined in MS mode using the following ToF conditions: sheath gas (N<sub>2</sub>) temperature at 365°C and gas flow rate of 10 l min<sup>-1</sup>; nebulizer gas pressure of 50 psi; drying gas temperature (N<sub>2</sub>) at 200°C and flow rate of 12 l min<sup>-1</sup>; capillary voltage (V<sub>cap</sub>) at 3000 V, nozzle voltage at 1000 V, fragmentor at 75 V, skimmer at 65 V and octopole at 750 V. The precursor ions [M-H]<sup>-</sup> analyzed were

$m/z$  206.99851 for *trans*- and *cis*-DCCA,  $m/z$  213.05572 for 3-PBA,  $m/z$  212.00955 for  $^{13}\text{C}_2$  1D *trans*-DCCA and 219.07585 for  $^{13}\text{C}_6$ -3-PBA. The A+2 isotope mass of Cl was used for  $^{13}\text{C}_2$  1D *trans*-DCCA to avoid interference with the isotope mass of the unlabelled standard. These curves were established by plotting the response factors as a function of the concentrations levels, over a maximum range of 15 to 1000 pmol ml<sup>-1</sup> depending on the analyte. The response factors corresponded to the peak-area ratios of each compound ion to the internal standard ion. The method detection limits (LOD) for *trans*-DCCA, *cis*-DCCA and 3-PBA were 18, 14 and 31 injected fmol, respectively, or 0.1-0.3 µg l<sup>-1</sup> of urine (equal to 3 standard deviations of response ratio of a blank reanalyzed at least 7 times on different days divided by mean slope of the standard curves). Repeatability from replicate analysis of urine samples under the same calibration and tuning conditions (blank samples spiked with authentic reference standards at two levels along with positive controls) ranged between 1.5 and 4.1%. The percentage of detection was 94% for *trans*-DCCA, 31% for *cis*-DCCA and 87% for 3-PBA.

#### *Creatinine correction*

Urinary levels were either expressed in creatinine-normalized concentrations (µmol/mol creatinine) or in excretion rates (pmol/h/kg of body weight). Creatinine was measured in urine by the Jaffé method, hence alkaline picric acid method with deproteinization (enzymatic colorimetric test PAP from Boehringer Mannheim, Germany).

### Data analysis

Both the concentrations ( $\mu\text{mol mol}^{-1}$  creatinine) and excreted rates ( $\text{nmol h}^{-1} \text{kg}^{-1}$  of body weight (b.w.)) of biomarkers of exposure were determined in every urine sample provided by the participants. Samples with undetectable levels were assigned a value of half the LOD for descriptive statistics. The cumulative urinary excretion time courses of the measured biomarkers in workers ( $\text{nmol kg}^{-1} \text{b.w.}$ ) were also determined over the three consecutive 24-h periods following the onset of the exposure episode.

Using a strategy similar to the one used in Bouchard *et al.* (2008; 2006; 2003), health risks of exposure to permethrin for each worker were assessed by comparing measured total daily excretion rates of biomarkers in each worker (amounts excreted in 24-h urine collection periods) to a biological reference value (BRV). The BRV was expressed as a daily urinary level of metabolite corresponding to an exposure dose limit below which the risks of adverse health effects should be negligible. It was derived using a published toxicokinetic model specific to this insecticide (Côté *et al.*, 2014), which allows to link absorbed dose scenarios to the time course of cumulative levels of biomarkers in urine over given time periods. Since an acute oral and chronic reference dose (RfD) for permethrin of  $0.25 \text{ mg kg}^{-1} \text{ b.w.}$  was available in the literature (U.S.EPA, 2009), this value was used to derive a BRV. From the RfD, an absorbed dose was established by considering an oral absorption fraction of 0.8 on the basis of a previously established toxicokinetic model (Côté *et al.*, 2014). The input scenario was then set so as to obtain the most conservative BRV, by accounting for the impact of the exposure route, time-scenario and most sensitive kinetic parameter, namely the absorption rate constant (Côté

*et al.*, 2014). Most conservative BRV was thus obtained by simulating the longest exposure period in the workers under study, which is a 15 h day<sup>-1</sup> exposure, such that the total absorbed daily dose was equal to the absorbed RfD dose (exposure RfD x 0.8 oral absorption fraction) (Côté *et al.*, 2014). It was also achieved by considering the slowest absorption rate found compatible with the available experimental data (Côté *et al.*, 2014), which is the one obtained from dermal exposures rather than inhalation or oral exposures, along with zero background at the start of the work day. With these input conditions, total urinary amounts of metabolites over the 24-h period following the onset of this exposure scenario were considered as BRVs.

Using the model of Côté *et al.* (2014), total absorbed daily doses following the onset of an exposure episode were further reconstructed for each worker on the basis of measured daily amounts of metabolites excreted in urine. In addition, urinary concentrations of the metabolites measured in the current study were compared to baseline values established in the general Canadian population, aged 6 to 79 years, as part of the Canadian Health Measures Survey (CHMS, 2013).

## RESULTS

### **Characteristics of exposure during the three days of the biomonitoring study**

Personal and work related characteristics of the twelve studied workers are presented in Tables 1-3. An applicator (T50), a supervisor (T51), both French Canadians, and ten Mexican corn harvesters (T52 to T61) were assessed. They were aged between 28 and 50 years old. Half of the workers reported having a high school degree as highest educational level, three a college degree and the rest a primary school level or not reported. Only a few workers reported taking medication (n = 3) or smoking (n = 1).

During the study period, none of the workers wore any dermal protective suite (dermal PPE). However, the applicator wore a mask with filter during preparation of Pounce formulation, but he did not wear it during spraying as he was in a vehicle with cabin. All of the workers except the supervisor wore long pants and gloves during field work or contact with pesticides, and half of the workers had long-sleeved shirts during their work. The nine harvesters and the supervisor spent approximately the same time in the treated area. For these workers, the average time per day spent in the fields during the three sampling days was 13.6 h, with a maximum of 15 h and a minimum of 12 h. The applicator had a very different schedule, and was in direct contact with permethrin only on the first day of the study, for a total period of 3.5 h, during mixing/loading and spraying of Pounce formulation, as well as cleaning of the equipment. The applicator reported not being in contact with other pyrethroid insecticides during the biomonitoring period, but sprayed pyrethroid formulations in the weeks before the study.

### Time-dependent variations in urinary excretion of metabolites

Only three of the twelve assessed workers presented time profiles indicative of an elevated occupational exposure during the study period. Figure 1 shows these time courses for *trans*-DCCA and 3-PBA in the urine of the applicator, the supervisor and one harvester (T50, T51 and, T60, respectively). Excretion values expressed in  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  creat. and  $\text{pmol h}^{-1} \text{kg}^{-1} \text{bw}$  are presented. For all workers, the profiles were similar for both units. For the applicator (T50), the time courses of *trans*-DCCA, *cis*-DCCA and 3-PBA appeared to evolve relatively in parallel, with *trans*-DCCA values being higher than 3-PBA values. *Cis*-DCCA was found in lowest levels at all times. A rise in excretion values was observed only at about 20 h following the onset of the 3.5 h mixing/loading/spraying period and peak levels were reached only at 29 h. Ensuing elimination exhibited a monoexponential decrease with an apparent elimination half-life of 6.4 h for *trans*-DCCA and 8.7 h for 3-PBA.

For the supervisor, very high concentrations of 3-PBA were observed at the onset of the sampling period followed by an elimination with an apparent half-life of 14 h (calculated >24 h following onset of biomonitoring or >16 h following the onset of first workday in permethrin-treated fields), indicative of an exposure to a 3-PBA forming pyrethroid, but not compatible with the reported time spent in permethrin-treated fields. Slight increase and decrease in 3-PBA excretion values were later observed during the first of the three 13 to 14-h periods spent in the permethrin-treated fields. On the other hand, variations in *trans*-DCCA excretion with time generally followed a pattern similar to that of 3-PBA, except in the first hours following the onset of sampling, but contrary to the applicator *trans*-DCCA levels were lower than 3-PBA values. Similar to 3-PBA, elimination half-

life of *trans*-DCCA in the urine of the supervisor was 12 h (calculated over the >24 h period following the onset of biomonitoring).

For the harvester, who spent 13 to 15 h in the permethrin-treated field during the three-day sampling, the excretion profiles of *trans*-DCCA and 3-PBA were compatible with a repeated daily exposure. Two of the three daily periods spent in the fields were reflected by clear increases and decreases in 3-PBA excretion during and following that time, with two prominent excretion peaks of 3-PBA observable about 4 to 7 h following the onset of a daily work shift in the fields. However, a slight shift in excretion values of 3-PBA compared to the reported periods in the fields was apparent. Again, these observed profiles did not allow calculating reliable apparent absorption and elimination half-lives, but show a rapid attrition following peak levels. For *trans*-DCCA profile in this harvester, it did not clearly follow that of 3-PBA, and as observed for the supervisor, *trans*-DCCA levels were lower than those of 3-PBA. Again *cis*-DCCA was present in lowest levels.

For the other nine harvesters, there were no clearly elevated excretions of *trans*-DCCA, *cis*-DCCA or 3-PBA typical of a contact specifically during the three-day work in permethrin-treated fields. However, there were wide variations in *trans*-DCCA, *cis*-DCCA and 3-PBA excretion values through time. Tables 4 and 5 show within-subject variations in excretion values, expressed in two different units ( $\mu\text{mol mol}^{-1}$  creat. and  $\text{pmol h}^{-1} \text{kg}^{-1}$  b.w.). The applicator and the supervisor had the most variable excretions through time compared to the harvesters. Furthermore, lower within-subject variability

was observed for creatinine-normalized concentrations as compared to weight-adjusted excretion rates for seven workers for *trans*-DCCA and five workers for 3-PBA.

### **Comparison of worker excretion values with population baseline values or biological reference values**

As also shown in Table 4, when compared to baseline values observed in the civilian general population as part of the Canadian Health Measures Survey (CHMS, 2013), within-subject geometric mean excretion concentrations of *trans*-DCCA in five workers were higher than the reported CHMS geometric mean of  $0.28 \mu\text{g g}^{-1}$  creatinine ( $0.15 \mu\text{mol mol}^{-1}$  creat.), but only the applicator and the supervisor showed upper limit values exceeding the reported 95<sup>th</sup> percentile value of the CHMS of  $3.0 \mu\text{g g}^{-1}$  creatinine ( $1.62 \mu\text{mol mol}^{-1}$  creat.). Similarly, within-subject geometric mean excretion concentrations of 3-PBA in five workers were higher than the reported CHMS geometric mean of  $0.42 \mu\text{g g}^{-1}$  creatinine ( $0.22 \mu\text{mol mol}^{-1}$  creatinine), but five workers also had upper limit values exceeding the reported 95<sup>th</sup> percentile value of the CHMS of  $2.8 \mu\text{g g}^{-1}$  creatinine ( $1.48 \mu\text{mol mol}^{-1}$  creatinine). The supervisor, with no protection, had the highest within-subject geometric mean and median, as well as highest upper limit values.

Furthermore, to obtain an indication of health risks associated with occupational exposure to permethrin, total daily amounts of *trans*-DCCA and 3-PBA excreted in the urine over the three-day collection period and corresponding absorbed daily doses were calculated. Daily excretions were also compared for each worker to proposed biological reference values: 29 and 12 nmol/kg/day for *trans*-DCCA and 3-PBA, respectively. Results show

that all of the workers exhibited values below the derived biological reference values (Table 6).

## DISCUSSION

### Kinetic profiles

To the best of our knowledge, this is the first study to characterize detailed urinary excretion profiles of exposure biomarkers for workers exposed to permethrin. The applicator excretion profiles were compatible with a single permethrin exposure during the study period, but peak excretion appeared later than expected (at 29 h following the onset of exposure) on the basis of excretion time course data in volunteers orally (on average 8 h) or dermally (on average 12 to 24 h depending on the study) exposed to a single dose of permethrin under controlled conditions (Ratelle *et al.*, 2014a; Tomalik-Scharte *et al.*, 2005; Woollen *et al.*, 1992). However, apparent elimination half-life of *trans*-DCCA and 3-PBA (6.4 and 8.7 h) for the applicator was similar to that observed following controlled oral exposure in volunteers (respective average of 5.4 and 5.7 h following ingestion) (Ratelle *et al.*, 2014a). According to the toxicokinetic model of Côté *et al.* (2014), the average oral absorption rate of *cis*- and *trans*-permethrin/cypermethrin is 0.32/0.46 h<sup>-1</sup> (*cis/trans*) (half-life of 2.2 and 1.5 h, respectively) while the average dermal absorption rate constant is 0.033/0.047 h<sup>-1</sup> (half-life of 20.9/14.7 h, respectively), suggesting that peak exposure in the applicator is *a priori* more compatible with a dermal exposure. Nonetheless, the model predicts that the time required to recover half the absorbed dose of permethrin as metabolites in urine is on average 8.6 h following oral exposure and 31.2 h following dermal exposure. Given that the apparent elimination half-life of metabolites for the applicator is more rapid than predicted from a dermal exposure, it appears that the applicator may rather have been exposed indirectly through hand-to-mouth contact following non protected contact with contaminated surfaces or clothing or

inadequate hygiene practices. Such possible inadvertent occupationally-related ingestion exposure has also been documented by other authors (HSE, 2007). Similarly, in an excretion time course study in applicators exposed to cypermethrin, peak excretion of *trans*-DCCA and 3-PBA was observed between 18 and 32 h following the onset of a mixing/loading/spraying of a cypermethrin formulation in three workers (Ratelle *et al.*, 2014b).

As for the supervisor, the time courses of 3-PBA and *trans*-DCCA in urine were compatible with multiple pyrethroid co-exposure during the first 24 h of biomonitoring and reconstructed absorbed daily doses indicate that this was the worker most exposed to pyrethroids (Table 6). The supervisor was the only worker not to wear long pants and gloves when working in the fields. The observed 3-PBA peak excretion at the onset of the biomonitoring period (in the first two samples collected prior to work in permethrin-treated fields) could not be attributed to permethrin exposure; the supervisor had explicitly stated that permethrin was not used during the days preceding sampling, but reported that lambda-cyhalothrin (Matador) was applied in adjacent fields. The differences between 3-PBA and *trans*-DCCA values (Fig 1C and Table 6) may be explained by the fact that 3-PBA is a major metabolite of lambda-cyhalothrin contrary to *trans*-DCCA (Kaneko, 2010). The apparent elimination half-life of 17 h for 3-PBA and 11 h for *trans*-DCCA for this supervisor is longer than expected from an acute oral or respiratory exposure (Côté *et al.*, 2014; Leng *et al.*, 1997b; Ratelle *et al.*, 2014a). According to Vermeulen *et al.* (2002), 10% of worker exposure is attributable to the respiratory route. Following controlled respiratory exposure to 160 µg m<sup>-3</sup> of cyfluthrin

for up to 60 min in four volunteers, peak levels of *trans*-DCCA in urine were reached at about 0.5 to 3 h and its mean apparent elimination half-life was calculated to be 6.2 h (Leng *et al.*, 1997b).

The kinetic time course of 3-PBA in the urine of the harvester depicted in Figure 1 (T60) shows two major peaks over the three-day sampling period, the initial rise in excretion values occurring prior to the onset of work in permethrin-treated fields. Moreover, the urinary excretion time course of *trans*-DCCA did not follow that of 3-PBA, with *trans*-DCCA values remaining fairly constant during the 78 h-collection period. As for the supervisor, a co-exposure to lambda-cyhalothrin during the study period is probable and 3-PBA rapid decrease following peak levels suggests that a significant dermal contribution to excreted levels is unlikely (Côté *et al.*, 2014). For the other nine harvesters, the urinary excretion pattern of both *trans*-DCCA and 3-PBA could not be associated with the specific three-day work in permethrin-treated fields, but allowed to obtain an overall view of excretion levels of workers during the high-season of pesticide spraying, along with significant urine-to-urine variability within individuals.

Among the twelve workers, the applicator (T50) and one harvester (T56) showed higher concentrations of *trans*-DCCA than those of 3-PBA. Conversely, the other workers exhibited 3-PBA values higher than those of *trans*-DCCA. Given that Pounce with a *cis:trans* ratio of permethrin of 40:60 was applied in the fields during the biomonitoring period and that both isomers generate 3-PBA while *trans*-DCCA originates only from *trans*-permethrin, 3-PBA levels in workers are expected to be 1.4 times higher than those

of *trans*-DCCA (Côté *et al.*, 2014; Ratelle *et al.*, 2014a). In the general Canadian population (CHMS, 2013), molar ratios of 3-PBA/*trans*-DCCA median concentrations were also in the order of 1.3-1.6, which represented exposure to all pyrethroids. The high *trans*-DCCA/3-PBA ratio observed in the urine samples of the applicator and one harvester may indicate a co-exposure to permethrin and another DCCA forming pyrethroid, such as the cyfluthrin (Leng *et al.*, 1997), but this was not corroborated by questionnaire data. This may also be explained by inter-individual variability in the metabolism of permethrin to 3-PBA and other phenoxy metabolites such as 4-hydroxy-3PBA (Woollen *et al.*, 1992). Conversely, the higher than expected 3-PBA/*trans*-DCCA ratio in the urine of four workers (*trans*-DCCA molar concentrations about 18 to 28% those of 3-PBA values) suggests a co-exposure to 3-PBA forming pyrethroids such as lambda-cyhalothrin (Ratelle *et al.*, 2014b), which was reported to have been applied in the fields during the weeks prior to biomonitoring.

### **Considerations for appropriate routine biomonitoring of workers exposed to permethrin**

Routine biomonitoring requires proper sampling strategy and expression of results. To assess appropriate sampling strategies in workers, a minimum set of information on the frequency and magnitude of exposure to pyrethroids is necessary. Repeated exposure to fairly constant concentrations at intervals compatible with the short elimination half-life of the key biomarker metabolites (<1 day) will lead to a rapid steady-state equilibrium and hence relatively constant daily metabolite excretions (Côté *et al.*, 2014). In that case, the sampling period is not as critical as variable sporadic weekly exposures, hence has

fairly little impact on resulting exposure estimates (Barr *et al.*, 2006). Harvesters are usually repeatedly exposed during the course of a typical workweek in pesticide-treated fields. In our study, most harvesters showed an excretion time course of *trans*-DCCA and 3-PBA compatible with this repeated exposure pattern (periodic small peaks in concentrations of metabolites). Conversely, the applicator showed an excretion time course of *trans*-DCCA and 3-PBA compatible with a single few hour-exposure over the three-day study period. In this case, knowledge of the time and duration of exposure is essential to collect samples at peak exposure. For routine biomonitoring of exposure, it would be ideal to perform repeated urine sampling for each worker during high spraying season. However, due cost and time restraints, this is not a practical solution. Collection of spot urine voids at a relevant time periods could provide a good overview of exposure in a large group of workers (Ratelle *et al.*, 2014b). On the other hand, to assess the level of exposure in a small group of workers, collection of multiple samples per worker is more appropriate. As proposed by Ratelle *et al.* (2014b), collection of the least three complete urine samples may provide an overall assessment of both baseline and peak exposure: i) urine voided prior to an exposure episode (spraying, field work); ii) end-of-shift void the day of onset of this exposure episode; iii) first morning void of the following morning.

The use of specific biomarkers is also important for proper biological monitoring (Barr *et al.*, 2006). Besides being specific, the biomarkers should be present in sufficient concentrations in the sampled matrix to be quantified. In other time course studies on short-lived pesticides generating multiple non specific metabolites, measurement of at

least two biomarkers of exposure was also suggested for a better identification of exposure to specific compounds (Berthet *et al.*, 2012; Ratelle *et al.*, 2014b). In our study, the two metabolites with highest detection rates by quadrupole ToF-MS detection were *trans*-DCCA and 3-PBA, and the *trans*-DCCA/*cis*-DCCA concentration ratio was on average of 4.5 for samples with detectable values. Although our analytical method led to similar method detection limits for *trans*-DCCA and *cis*-DCCA, due to the low detection rates of *cis*-DCCA, this biomarker was not used in subsequent analyses. Other biomonitoring studies in the general Canadian and US population reported higher detection rates for *cis*-DCCA by triple-quadrupole MS detection, and a *trans*-/*cis*-DCCA concentration ratio close to 2 (CHMS, 2013; Couture *et al.*, 2009; Fortin *et al.*, 2008; Ratelle *et al.*, 2014b). The observed *trans*-DCCA/*cis*-DCCA concentration ratio in our worker biomonitoring study is more compatible with an exposure to a *trans*/*cis*-permethrin-based formulation of 75:25. Although optimization of the ESI ionization parameters to obtain higher detection rates of the *cis*-DCCA metabolite would be necessary for future biomonitoring in poorly exposed individuals, the reflectron ToF mass analyzer has been shown to provide better selectivity of precursor ions than triple-quadrupole detectors because of the higher resolving power of the reflectron-ToF mass analyzer and hence higher mass accuracy (Steen *et al.*, 2001).

With regard to the units of expression of biomonitoring results, most of the urinary pyrethroid metabolite results are reported as creatinine-normalized concentrations or excretion rates per kg bw (CHMS, 2013; Couture *et al.*, 2009; Fortin *et al.*, 2008; NHANES, 2009). Our study has shown that urinary excretion profiles in workers were

overall similar when *trans*-DCCA and 3-PBA excretions were expressed as both units. Reporting excretion rates facilitates comparison with reference values as such as acceptable daily intakes (ADI) (Barr *et al.*, 2006), but requires timed collections. On the other hand, creatinine-normalized concentrations are reported in National surveys such as the CHMS (2013), and are considered to account for variations in urine dilution and compensate for incomplete sampling, although creatinine excretion rate (<24 h) may vary widely through time and among individuals (Boeniger *et al.*, 1993; Viau *et al.*, 2004). Nonetheless, our study showed less variable excretion values of 3-PBA and *trans*-DCCA through time in workers when expressed as creatinine-normalized concentrations rather than hourly excretion rates per unit of body weight, suggesting that creatinine normalization may also adjust for body-weight normalized dose in addition to the varying degree of dilution of the urine (Viau *et al.*, 2004).

## Captions to figures

Figure 1: Time courses of *trans*-DCCA (●) and 3-PBA (Δ) in the urine of workers during the three-day biomonitoring period, with values expressed in concentrations (μmol/mol creat.; A, C, E) or in excretion rates (pmol/h/kg bw; B, D, F). A and B = applicator; C and D = supervisor; E and F = harvester. The exposure periods are indicated for each day (■).

## **CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The present study was supported by the *Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et sécurité du travail du Québec* (IRSST). Stéphanie Ferland was granted a M.Sc scholarship from the Faculty of Medicine of the University of Montreal and from the IRSST.

## REFERENCES

- Aktar MW, Sengupta D, Chowdhury A. (2009) Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdiscip Toxicol*; 2(1): 1-12.
- Anadon A, Martinez-Larranaga MR, Diaz MJ *et al.* (1991) Toxicokinetics of permethrin in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol*; 110(1): 1-8.
- Barr DB, Olsson AO, Wong LY *et al.* (2010) Urinary concentrations of metabolites of pyrethroid insecticides in the general U.S. population: National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2002. *Environ Health Perspect*; 118(6): 742-748.
- Barr DB, Thomas K, Curwin B *et al.* (2006) Biomonitoring of exposure in farmworker studies. *Environ Health Perspect*; 114(6): 936-942.
- Berthet A, Heredia-Ortiz R, Vernez D *et al.* (2012) A detailed urinary excretion time course study of captan and folpet biomarkers in workers for the estimation of dose, main route-of-entry and most appropriate sampling and analysis strategies. *Ann Occup Hyg*; 56(7): 815-828.
- Boeniger MF, Lowry LK, Rosenberg J. (1993) Interpretation of urine results used to assess chemical exposure with emphasis on creatinine adjustments: a review. *Am Ind Hyg Assoc J*; 54(10): 615-627.
- Bouchard M, Carrier G, Brunet RC. (2008) Assessment of absorbed doses of carbaryl and associated health risks in a group of horticultural greenhouse workers. *Int Arch Occup Environ Health*; 81(3): 355-370.
- Bouchard M, Carrier G, Brunet RC *et al.* (2006) Biological monitoring of exposure to organophosphorus insecticides in a group of horticultural greenhouse workers. *Ann Occup Hyg*; 50(5): 505-515.

- Bouchard M, Gosselin NH, Brunet RC *et al.* (2003) A toxicokinetic model of malathion and its metabolites as a tool to assess human exposure and risk through measurements of urinary biomarkers. *Toxicol Sci*; 73(1): 182-194.
- Bradberry SM, Cage SA, Proudfoot AT *et al.* (2005) Poisoning due to pyrethroids. *Toxicol Rev*; 24(2): 93-106.
- Cantalamesa F. (1993) Acute toxicity of two pyrethroids, permethrin, and cypermethrin in neonatal and adult rats. *Arch Toxicol*; 67(7): 510-513.
- CHMS. (2013). *Second Report on Human Biomonitoring of Environmental Chemicals in Canada: Canadian Health Measures Survey (CHMS)-Cycle 2 (2009-2011)*.
- Côté J, Bonvalot Y, Carrier G *et al.* (2014) A novel toxicokinetic modeling of cypermethrin and permethrin and their metabolites in humans for dose reconstruction from biomarker data. *PLoS One*; 9(2): e88517.
- Couture C, Fortin MC, Carrier G *et al.* (2009) Assessment of exposure to pyrethroids and pyrethrins in a rural population of the Monteregie area, Quebec, Canada. *J Occup Environ Hyg*; 6(6): 341-352.
- Crawford MJ, Croucher A, Hutson DH. (1981) Metabolism of cis- and trans-cypermethrin in rats. Balance and tissue retention study. *J Agric Food Chem*; 29(1): 130-135.
- Crow JA, Borazjani A, Potter PM *et al.* (2007) Hydrolysis of pyrethroids by human and rat tissues: examination of intestinal, liver and serum carboxylesterases. *Toxicol Appl Pharmacol*; 221(1): 1-12.
- Fortin MC, Bouchard M, Carrier G *et al.* (2008) Biological monitoring of exposure to pyrethrins and pyrethroids in a metropolitan population of the Province of Quebec, Canada. *Environ Res*; 107(3): 343-350.
- Gorse I, Balg C. (2014). *Bilan des ventes de pesticides au Québec*. Web: Retrieved from <http://www.mddelcc.gouv.qc.ca/pesticides/bilan/bilan2011.pdf>.

- Hardt J, Angerer J. (2003) Biological monitoring of workers after the application of insecticidal pyrethroids. *Int Arch Occup Environ Health*; 76(7): 492-498.
- HSE. (2007). Inadvertent ingestion exposure in the workplace. Research Park North, Riccarton, Edinburgh: Institute for Occupational Medicine, Health and Safety Executive (HSE).
- Kaneko H. (2010). Pyrethroid chemistry and metabolism *Kriedger, R. (Eds), Hayes Handbook of pesticide toxicology* (pp. 1635-1663): Academic Press.
- Kaneko H, Miyamoto J. (2001) Pyrethroid chemistry and metabolism. *Handbook of Pesticide Toxicology*: 1263-1288.
- Le Grand R, Dulaurent S, Gaulier JM *et al.* (2011) Simultaneous determination of five synthetic pyrethroid metabolites in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to 39 persons without known exposure to pyrethroids. *Toxicol Lett*; 210(2): 248-253.
- Leng G, Kuhn KH, Idel H. (1996) Biological monitoring of pyrethroid metabolites in urine of pest control operators. *Toxicol Lett*; 88(1-3): 215-220.
- Leng G, Leng A, Kuhn KH *et al.* (1997) Human dose-excretion studies with the pyrethroid insecticide cyfluthrin: urinary metabolite profile following inhalation. *Xenobiotica*; 27(12): 1273-1283.
- Leng G, Ranft U, Sugiri D *et al.* (2003) Pyrethroids used indoors--biological monitoring of exposure to pyrethroids following an indoor pest control operation. *Int J Hyg Environ Health*; 206(2): 85-92.
- MAPAQ. (2012). *L'emploi bioalimentaire*. Government of Quebec website: Retrieved from <http://www.mapaq.gouv.qc.ca/Fr/Productions/md/statistiques/emploi/pages/emploi.aspx>.
- NHANES. (2009). Fourth national report on human exposure to environmental chemicals. National Health and Nutrition Examination Survey (pp. 529). Atlanta, GA.
- NRC. (1994). *Health Effects of Permethrin-Impregnated Army Battle-Dress Uniforms*. Washington D.C.: National Academy Press.

- Panuwet P, Prapamontol T, Chantara S *et al.* (2008) Concentrations of urinary pesticide metabolites in small-scale farmers in Chiang Mai Province, Thailand. *Sci Total Environ*; 407(1): 655-668.
- PMRA. (2008). Pounce (pp. 24): Agri-reseau.
- Ratelle M, Côté J, Bouchard M. (2014a) Toxicokinetics of permethrin biomarkers of exposure in orally exposed volunteers.
- Ratelle M, Côté J, Bouchard M. (2014b) Within and between-subject variability assessed from time courses of pyrethroid biomarkers of exposure in a group of agricultural workers in Quebec, Canada. *Int J Hyg Environ Health*.
- Scollon EJ, Starr JM, Godin SJ *et al.* (2009) In vitro metabolism of pyrethroid pesticides by rat and human hepatic microsomes and cytochrome p450 isoforms. *Drug Metab Dispos*; 37(1): 221-228.
- Soderlund DM, Clark JM, Sheets LP *et al.* (2002) Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*; 171(1): 3-59.
- Steen H, Kuster B, Mann M. (2001) Quadrupole time-of-flight versus triple-quadrupole mass spectrometry for the determination of phosphopeptides by precursor ion scanning. *J Mass Spectrom*; 36(7): 782-790.
- Tomalik-Scharte D, Lazar A, Meins J *et al.* (2005) Dermal absorption of permethrin following topical administration. *Eur J Clin Pharmacol*; 61(5-6): 399-404.
- U.S.EPA. (2009). *Reregistration Eligibility Decision (RED) for Permethrin*. (EPA 738-R-09-306). web: Retrieved from <http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/REDS/permethrin-red-revised-may2009.pdf>.
- U.S.EPA. (2012). Pounce 3.2 EC (pp. 13). Philadelphia: Agricultural Products Group.
- Vermeulen R, Stewart P, Kromhout H. (2002) Dermal exposure assessment in occupational epidemiologic research. *Scand J Work Environ Health*; 28(6): 371-385.

- Viau C, Lafontaine M, Payan JP. (2004) Creatinine normalization in biological monitoring revisited: the case of 1-hydroxypyrene. *Int Arch Occup Environ Health*; 77(3): 177-185.
- Wang D, Kamijima M, Imai R *et al.* (2007) Biological monitoring of pyrethroid exposure of pest control workers in Japan. *J Occup Health*; 49(6): 509-514.
- Woollen BH, Marsh JR, Laird WJ *et al.* (1992) The metabolism of cypermethrin in man: differences in urinary metabolite profiles following oral and dermal administration. *Xenobiotica*; 22(8): 983-991.
- Zhao M, Chen F, Wang C *et al.* (2010) Integrative assessment of enantioselectivity in endocrine disruption and immunotoxicity of synthetic pyrethroids. *Environ Pollut*; 158(5): 1968-1973.

Table 1. Personal information on each worker, as documented by self-administered questionnaire.

Worker	Age	Weight (kg)	Height (cm)	Highest educational level	Frequency of sports activities	Number of portions of fruits and vegetables on average per day <sup>b</sup>	Consumption of medication or tobacco <sup>b</sup>	Residential usage of pesticides <sup>b</sup>
T50 <sup>a</sup>	32	70	182	College	1-3 times per month	6.5	No	No
T51 <sup>a, c</sup>	50	63	162	NR <sup>d</sup>	None	8	No	No
T52	36	70	170	High school	> 3 times per week	11	Complex B50	No
T53	50	98	170	Primary school	2-3 times per week	4.5	No	No
T54	36	70	158	High school	1-3 times per month	NR	No	No
T55	39	86	170	High school	None	2	No	No
T56	30	78	164	College	None	3	Ibuprofen, XL3 grippa	No
T57	28	72	174	College	2-3 times per week	3	No	No
T58	33	79	170	Primary school	None	3	No	No
T59	42	65	160	High school	None	1	Piroxican	No
T60	38	75	167	High school	Once per week	4.5	Tobacco	No
T61	48	78	166	High school	Once per week	3	No	No

<sup>a</sup> French Canadian workers; the other workers were of Latin American origin.

<sup>b</sup> Data referring to a three-day biomonitoring period.

<sup>c</sup> The only female worker.

<sup>d</sup> NR = not reported.

Table 2. Exposure conditions for each worker during the three-day biomonitoring period, as documented by self-administered questionnaire.

Worker	Tasks	Protective equipment and clothing	Exposure duration (h) <sup>a</sup>		
			Day 1	Day 2	Day 3
T50	-Mixing/loading of Pounce -Spraying in tractor with cabin -Cleaning of equipment	-Mask with filter, Long-sleeved shirt, long pants and gloves -Long-sleeved shirt, long pants and gloves -Glasses, long-sleeved shirt, long pants and gloves	3,5 <sup>b</sup>	0	0
T51	Supervision	No protective equipment reported	14	13	14
T52	Harvest	Hat, long pants and gloves	15	13	14
T53	Harvest	Long pants and gloves	14	13	14
T54	Harvest and irrigation	Pant and gloves	14	13	14
T55	Harvest	Long-sleeved shirt, long pants and gloves	14	13	14
T56	Harvest	Long-sleeved shirt, long pants and gloves	14	13	14
T57	Harvest and maintenance	Long-sleeved shirt, long pants and gloves	14	13	14
T58	Harvest	Hat, Long-sleeved shirt, long pants and gloves	12	13	14
T59	Harvest	Long pants and gloves	14	13	14

---

T60	Harvest	Hat, long-sleeved shirt, long pants and gloves	14	13	14
T61	Harvest and maintenance	Long-sleeved shirt, long pants and gloves	14	13	14

---

<sup>a</sup> Exposure duration of the supervisor and harvesters corresponds to the number of hours per day spent in the treated area.

<sup>b</sup> The applicator spent 2 h preparing the formulation containing permethrin and 1.5 h spraying in the field.

Table 3. Descriptive statistics of the group of workers.

Sex	Male: n	11
	Female: n	1
Age	Mean (min - max)	38.5 (28 - 50)
Weight (Kg)	Mean (min - max)	75.3 (63 - 98)
Height (cm)	Mean (min - max)	167.8 (158 - 182)
Country of Birth	Canada: % (n)	17% (2)
	Mexico: % (n)	83% (10)
Mother tongue	French: % (n)	17% (2)
	Spanish: % (n)	83% (10)
Highest educational level	Primary school: % (n)	17% (2)
	High school: % (n)	50% (6)
	College: % (n)	25% (3)
Number of portions of fruits and vegetables on average per day	Mean (min - max)	4.4 (1 - 10)
Consumption of medication or smoking	Medication: (n)	3
	Smoking: (n)	1

Tasks	Application: (n)	1
	Supervision: (n)	1
	Harvest: (n)	10
Protective equipment	Long pants: (n)	11
	Long-sleeved shirt: (n)	7
	Gloves: (n)	11
Average exposure duration (h/day)	Applicator: Mean (min - max)	1.2 (0 - 3.5)
	Harvester and supervisor: Mean (min - max)	13.6 (12 - 15)

---

Table 4. Within-subject distribution in *trans*-DCCA and 3-PBA urinary concentrations ( $\mu\text{mol/mol}$  creatinine) over the course of the 3-day biomonitoring period following the onset of exposure to permethrin<sup>a</sup>

Worker	Number of urine samples per worker	Concentrations of <i>trans</i> -DCCA in urine ( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ creatinine)					Concentrations of 3-PBA in urine ( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ creatinine)				
		Geometric mean	Median	Minimum	95 <sup>th</sup> percentile	Maximum	Geometric mean	Median	Minimum	95 <sup>th</sup> percentile	Maximum
T50	17	0.252 <sup>b</sup>	0.110	0.054	2.675 <sup>d</sup>	4.609 <sup>d</sup>	0.148	0.200 <sup>c</sup>	< LOD	1.066	1.820 <sup>d</sup>
T51	13	0.605 <sup>b</sup>	0.570 <sup>c</sup>	0.136	2.674 <sup>d</sup>	2.876 <sup>d</sup>	2.557 <sup>b</sup>	2.281 <sup>c</sup>	0.571	18.876 <sup>d</sup>	27.941 <sup>d</sup>
T52	15	0.039	0.048	< LOD	0.106	0.114	0.212	0.206 <sup>c</sup>	0.099	0.490	0.682
T53	17	0.129	0.146 <sup>c</sup>	0.043	0.257	0.287	0.467 <sup>b</sup>	0.449 <sup>c</sup>	0.192	0.897	0.940
T54	14	0.216 <sup>b</sup>	0.268 <sup>c</sup>	0.079	0.440	0.525	0.258 <sup>b</sup>	0.241 <sup>c</sup>	0.052	0.726	0.895
T55	18	0.102	0.102	< LOD	0.403	0.489	0.439 <sup>b</sup>	0.362 <sup>c</sup>	0.131	3.494 <sup>d</sup>	5.007 <sup>d</sup>
T56	22	0.038	0.080	< LOD	0.129	0.167	0.032	0.072	< LOD	0.325	0.534
T57	17	0.039	0.058	< LOD	0.107	0.151	0.052	0.161	< LOD	0.485	0.490
T58	12	0.086	0.079	0.051	0.143	0.157	0.098	0.183 <sup>c</sup>	< LOD	0.438	0.512
T59	13	0.194 <sup>b</sup>	0.197 <sup>c</sup>	0.085	0.360	0.375	0.180	0.273 <sup>c</sup>	< LOD	0.589	0.633
T60	13	0.089	0.105	< LOD	0.298	0.317	0.127	0.228 <sup>c</sup>	< LOD	1.661 <sup>d</sup>	1.755 <sup>d</sup>
T61	20	0.376 <sup>b</sup>	0.455 <sup>c</sup>	0.122	1.069	1.269	0.652 <sup>b</sup>	0.802 <sup>c</sup>	0.240	1.527 <sup>d</sup>	1.978 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Exposure conditions as described in Table 2.

<sup>b</sup> Value exceeding the geometric mean (GM) reported in the Canadian Health Measures Survey (CHMS) for 6 to 79 years-old (cycle 2) (CHMS 2013). CHMS GM for *trans*-DCCA: 0.28  $\mu\text{g g}^{-1}$  creatinine (0.15  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  creatinine); CHMS GM for 3-PBA: 0.42  $\mu\text{g g}^{-1}$  creatinine (0.22  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  creatinine).

<sup>c</sup> Value exceeding the median reported in the Canadian Health Measures Survey (CHMS) for 6 to 79 years-old (cycle 2) (CHMS 2013). CHMS median for *trans*-DCCA: 0.20  $\mu\text{g g}^{-1}$  creatinine (0.11  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  creatinine); CHMS median for 3-PBA: 0.33  $\mu\text{g g}^{-1}$  creatinine (0.17  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  creatinine).

<sup>d</sup> Value exceeding the 95<sup>th</sup> percentile (95<sup>th</sup> CI) reported in the Canadian Health Measures Survey (CHMS) for 6 to 79 years-old (cycle 1) (CHMS 2013). CHMS 95<sup>th</sup> CI for *trans*-DCCA: 3.0  $\mu\text{g g}^{-1}$  creatinine (1.62  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  creatinine); CHMS 95<sup>th</sup> CI for 3-PBA: 2.8  $\mu\text{g g}^{-1}$  creatinine (1.48  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  creatinine).

Table 5. Within-subject distribution in *trans*-DCCA and 3-PBA urinary excretion rates (pmol h<sup>-1</sup> kg<sup>-1</sup> bw) over the course of the 3-day biomonitoring period following the onset of exposure to permethrin<sup>a</sup>

Worker	Number of urine samples per worker	<i>trans</i> -DCCA urinary excretion rates (pmol h <sup>-1</sup> kg <sup>-1</sup> bw)					3-PBA urinary excretion rates (pmol h <sup>-1</sup> kg <sup>-1</sup> bw)				
		Geometric mean	Median	Minimum	95 <sup>th</sup> percentile	Maximum	Geometric mean	Median	Minimum	95 <sup>th</sup> percentile	Maximum
T50	17	2.982	1.582	0.595	31.476	52.237	1.647	2.252	< LOD	12.741	20.625
T51	13	3.487	2.987	0.522	61.760	115.171	13.670	15.688	2.200	86.937	133.537
T52	15	0.294	0.331	< LOD	1.035	1.334	1.593	1.760	0.490	3.373	3.825
T53	17	0.655	0.674	0.098	1.783	2.237	2.362	2.020	0.978	5.959	8.589
T54	14	1.456	1.446	0.343	4.379	4.828	1.914	1.637	0.638	5.024	5.775
T55	18	0.803	0.682	< LOD	7.129	11.967	3.188	2.005	0.851	28.781	35.429
T56	22	0.363	0.771	< LOD	1.333	1.351	0.271	0.856	< LOD	2.280	2.979
T57	17	0.372	0.545	< LOD	0.969	1.481	0.450	1.550	< LOD	3.462	4.754
T58	12	0.647	0.669	0.288	1.304	1.329	0.862	1.469	< LOD	3.308	4.329
T59	13	1.018	1.245	0.303	2.532	2.532	1.291	1.559	0.091	4.920	5.236
T60	13	0.523	0.562	< LOD	1.821	2.422	0.800	1.474	< LOD	14.033	15.023
T61	20	2.424	2.668	0.564	6.472	7.019	4.255	4.964	1.032	13.720	18.828

<sup>a</sup> Exposure conditions as described in Table 2.

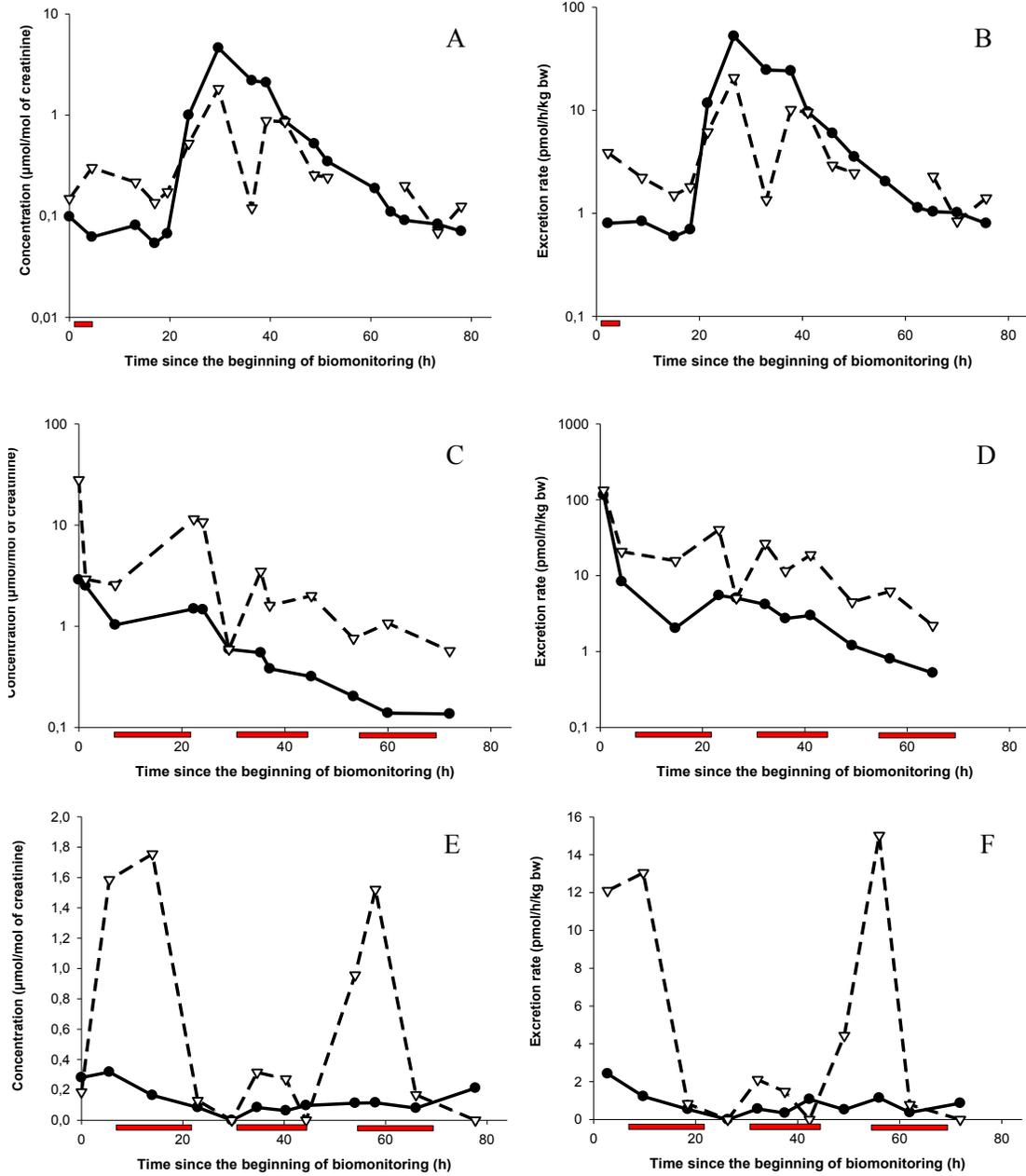
Table 6. Daily excretion rates of *trans*-DCCA and 3-PBA in the urine of workers during the three-day biomonitoring period following the onset of an exposure period to permethrin, reconstructed absorbed daily doses and comparison with proposed biological reference values (BRVs)

	<i>Trans</i> -DCCA							3-PBA						
	Daily excretion rates (pmol d <sup>-1</sup> kg <sup>-1</sup> bw)			Reconstructed absorbed daily dose (pmol d <sup>-1</sup> kg <sup>-1</sup> bw)			Fraction of the BRV <sup>a,b</sup>	Daily excretion rates (pmol d <sup>-1</sup> kg <sup>-1</sup> bw)			Reconstructed absorbed daily dose (pmol d <sup>-1</sup> kg <sup>-1</sup> bw)			Fraction of the BRV <sup>a,b</sup>
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 1	Day 2	Day 3		Day 1	Day 2	Day 3	Day 1	Day 2	Day 3	
	T50	3.00	30.11	2.93	164.9	1658.1	161.3	0.058	3.49	10.19	1.25	308.9	902.2	110.7
T51	14.19	3.53	4.84	873.4	217.0	298.2	0.030	68.95	16.92	24.61	6824.0	1674.3	2435.7	0.586
T52	0.60	0.62	0.19	34.1	35.6	11.1	0.001	2.58	1.89	1.36	236.3	173.5	124.3	0.020
T53	1.34	0.76	1.20	52.0	29.6	46.5	0.002	3.89	3.21	3.82	242.5	200.0	238.4	0.021
T54	2.93	2.05	0.81	162.1	113.7	45.0	0.006	3.97	1.71	0.94	353.9	152.6	83.7	0.030
T55	2.69	1.92	0.38	121.4	86.4	17.0	0.004	15.39	2.92	1.93	1115.8	211.9	140.2	0.096
T56	1.14	1.18	0.43	56.6	58.9	21.6	0.002	1.61	0.82	0.47	128.9	65.4	37.4	0.011
T57	0.98	0.48	0.59	52.8	26.1	31.6	0.002	3.25	1.72	0.73	281.5	148.5	63.6	0.024
T58	0.91	0.72	0.74	44.6	35.5	36.3	0.002	1.73	1.83	1.37	136.3	144.6	108.5	0.012
T59	0.94	2.00	0.60	55.8	119.2	35.9	0.004	1.29	2.36	1.16	123.7	226.7	111.2	0.019
T60	1.86	0.45	0.62	96.4	23.3	32.0	0.003	8.93	0.94	5.37	742.4	78.1	446.0	0.064
T61	6.66	3.03	1.67	331.1	150.5	83.2	0.011	11.04	4.84	4.49	882.2	387.1	359.2	0.076

<sup>a</sup> Biological reference values estimated with the model, and corresponding 3-PBA and *trans*-DCCA daily excretion simulated with a conservative 15-h dermal exposure scenario to an absorbed dose value corresponding to 80% of the RfD of 0.25 mg kg<sup>-1</sup> b.w. of permethrin with a ratio *cis/trans* of 40:60 (U.S. EPA 2009).

<sup>b</sup> Value for the worst case scenario.

Figure 1



### **3. Discussion générale**

Ce projet a permis de dresser le profil cinétique de métabolites de la perméthrine chez des travailleurs agricoles en situation réelle d'exposition. Pour ce faire, des biomarqueurs d'exposition à la perméthrine ont été mesurés dans toutes les urines des travailleurs sur une période de trois jours. L'objectif en construisant ces profils était de pouvoir émettre des recommandations de surveillance biologique en routine. Dans cette section, la méthodologie utilisée pour cette étude sera évaluée. Par la suite, des résultats complémentaires à l'article seront présentés. Tout d'abord, il y aura une comparaison entre les données pré- et post-exposition, puis il y aura une comparaison avec les données d'autres études. La section terminera sur le rôle de cette étude dans un projet plus vaste portant sur l'exposition aux pyréthrinoïdes.

#### **3.1. Évaluation de l'approche utilisée**

La première étape a été de recruter des travailleurs agricoles de la région de la Montérégie. Afin de pouvoir dresser le profil cinétique des métabolites de la perméthrine, toutes les urines de chaque travailleur ont été recueillies durant trois jours. L'avantage de collecter toutes les urines sur plusieurs jours est de pouvoir dresser un portrait fidèle de l'exposition. Cependant, la grande quantité d'échantillons par travailleur rend impossible l'utilisation de cette méthode à grande échelle. Aussi, l'investissement de temps demandé aux participants est plus important ce qui diminue le nombre de volontaires potentiels. C'est pourquoi uniquement douze travailleurs ont été recrutés pour ce projet. Un

échantillon d'urine a également été demandé plus d'une semaine avant l'entrée dans un champ traité afin de documenter le niveau de base des travailleurs.

En plus des échantillons d'urine, des questionnaires ont été administrés aux travailleurs. Le but était d'obtenir des informations complémentaires sur les habitudes de vie et de travail des participants. Les informations consignées dans les questionnaires visaient à cibler des facteurs pouvant expliquer la variabilité dans les profils cinétiques. En effet, l'alimentation et l'exposition domestique à des pyréthrinoïdes peuvent faire varier les données (Julien *et al.*, 2008). De plus, ces questionnaires étaient nécessaires pour obtenir les informations essentielles à la reconstruction des doses absorbées. Le problème avec les questionnaires était l'assiduité des participants à les remplir. En effet, à chaque jour, ils devaient remplir un questionnaire. Ceux des premières journées étaient bien remplis, mais le nombre de questions laissées sans réponse augmentait beaucoup dans les derniers jours. De plus, les données compilées dans les questionnaires apportaient des informations importantes qui permettaient de mieux interpréter les niveaux biologiques mesurés dans l'urine. Cependant, plusieurs informations manquaient pour relier un niveau d'exposition à un moment donné avec une tâche ou une activité précise. Par exemple, pour l'alimentation, les heures de repas ainsi que les portions de céréales et de fruits et légumes étaient indiquées. Par contre, cela ne donnait pas de renseignement sur la présence ou non de résidus de pyréthrinoïdes dans ces aliments. Un autre élément qui a peu été renseigné par les participants dans les questionnaires est l'utilisation d'un autre pyréthrinoïde, malgré une section du questionnaire dédiée à cet effet. En effet, la superviseure a noté que du Matador (lambda-cyhalothrine) avait été

utilisé dans des champs adjacents, mais aucune donnée supplémentaire n'a été fournie. Des informations sur le moment et le mode d'application et sur la proximité des champs traités auraient pu aider à exclure ou non la présence d'une co-exposition.

Pour la surveillance biologique de pesticides non-persistants comme la perméthrine, l'utilisation de biomarqueurs est recommandée (Barr *et al.*, 2006). Les biomarqueurs ont l'avantage de prendre en compte toutes les voies d'exposition. À l'opposé, il est difficile de retracer exactement quelles tâches ou activités sont à l'origine de l'exposition. Le choix d'un bon biomarqueur est essentiel. Il est important de prendre la molécule la plus spécifique possible et qui représente le mieux la substance à l'étude. Le *trans*-DCCA, le *cis*-DCCA et le 3-PBA sont des métabolites de la perméthrine. Leur quantification permet de retracer et de calculer le niveau d'exposition à la perméthrine. L'inconvénient est qu'ils ne sont pas spécifiques uniquement à la perméthrine. Effectivement, ils sont aussi des métabolites d'autres pyréthriinoïdes. Simplement sur la base de la mesure de ces métabolites, il n'est pas possible de déterminer si le travailleur a été exposé seulement à la perméthrine ou s'il a subi une co-exposition.

Un deuxième point important est le choix de la matrice. Premièrement, la substance doit se retrouver en concentration suffisante dans la matrice pour être quantifiable. Pour la perméthrine, ses métabolites peuvent être analysés dans l'urine et le sang. De plus, pour obtenir des résultats représentatifs des conditions réelles d'exposition, il est important que la prise de données n'affecte pas la routine des travailleurs. Puisque la prise de sang est plus invasive et demande beaucoup de temps et de matériel, l'utilisation

de l'urine a été favorisée. Afin de réduire l'incidence de la collecte d'urine sur le travail des participants, des glacières contenant plusieurs bouteilles Nalgène ainsi que des étiquettes ont été fournies. Les travailleurs y avaient accès directement sur leur lieu de travail.

Pour la quantification des métabolites, un système de chromatographie liquide à ultra haute performance couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol a été utilisé comme instrument analytique. Les pourcentages de détection ont été de 94% pour le *trans*-DCCA, de 31% pour le *cis*-DCCA et de 87% pour le 3-PBA. Le faible pourcentage de détection pour le *cis*-DCCA explique pourquoi ce métabolite a été exclu des analyses et ne se retrouve donc pas dans les tableaux des résultats. Avec la méthode analytique actuelle, le *cis*-DCCA ne pourrait pas être utilisé comme biomarqueur d'exposition. Cependant, en optimisant la méthode, il serait possible de l'inclure dans la surveillance biologique.

### **3.2 Comparaison des données post-exposition avec celles de pré-exposition**

Le moment où débute l'exposition n'est pas le même pour l'aplicateur que pour les autres travailleurs. L'aplicateur a commencé à être exposé le soir, au moment où il a préparé la solution de perméthrine. Il n'a fourni qu'une seule urine de pré-exposition. Les autres travailleurs ont débuté leur exposition le matin lors de l'entrée dans un champ qui avait été traité. Ils ont collecté trois urines avant l'exposition, soit neuf jours avant l'entrée

dans un champ, la veille et la première urine du matin le jour même. Les cueilleurs T53 et T58 n'ont pas collecté leur urine la veille.

Tableau I. Concentrations de *trans*-DCCA et 3-PBA ( $\mu\text{mol/mol}$  de créatinine) dans des collectes urinaires pré et post-exposition à la perméthrine

	Concentrations de <i>trans</i> -DCCA					Concentrations de 3-PBA				
	( $\mu\text{mol/mol}$ de créatinine)					( $\mu\text{mol/mol}$ de créatinine)				
	Pré		Post			Pré		Post		
	9 jours <sup>a</sup>	Veille <sup>b</sup>	Matin <sup>c</sup>	MG <sup>d</sup>	Max <sup>e</sup>	9 jours <sup>a</sup>	Veille <sup>b</sup>	Matin <sup>c</sup>	MG <sup>d</sup>	Max <sup>e</sup>
T50 <sup>f</sup>	ND <sup>g</sup>	ND	0,01 <sup>h</sup>	0,30	4,61	ND	ND	0,15	0,14	1,82
T51 <sup>i</sup>	0,06	2,88	2,51	0,45	1,49	0,83	27,94	2,91	1,99	11,46
T52 <sup>j</sup>	0,05	0,06	0,05	0,04	0,11	0,08	0,39	0,10	0,21	0,68
T53 <sup>j</sup>	0,08	ND	0,05	0,14	0,29	0,31	ND	0,19	0,50	0,94
T54 <sup>j</sup>	0,07	0,38	0,28	0,20	0,53	0,07	0,14	0,48	0,26	0,90
T55 <sup>j</sup>	ND	0,34	0,49	0,09	0,38	ND	5,01	2,04	0,34	3,12
T56 <sup>j</sup>	0,07	0,05	0,08	0,04	0,17	0,21	0,53	0,12	0,03	0,33
T57 <sup>j</sup>	0,16	0,09	0,15	0,03	0,09	0,28	0,49	0,48	0,04	0,25
T58 <sup>j</sup>	0,04	ND	0,07	0,09	0,16	<LOD <sup>k</sup>	ND	0,02	0,12	0,51
T59 <sup>j</sup>	0,08	0,15	0,14	0,20	0,38	<LOD	<LOD	0,44	0,24	0,63
T60 <sup>j</sup>	0,72	0,28	0,32	0,07	0,21	0,18	0,19	1,59	0,10	1,76
T61 <sup>j</sup>	0,14	0,48	1,27	0,34	1,05	<LOD	0,68	1,48	0,62	1,98

<sup>a</sup> La première urine du matin collectée neuf jours avant l'entrée dans un champ traité à la perméthrine

<sup>b</sup> La dernière urine de la journée précédant le début de l'entrée dans un champ traité

<sup>c</sup> Première urine de la journée où les travailleurs sont entrés dans un champ traité

<sup>d</sup> Moyenne géométrique de toutes les urines suivant le début de l'exposition

<sup>e</sup> Maximum atteint parmi les urines suivant le début de l'exposition

<sup>f</sup> L'applicateur

<sup>g</sup> ND = non déterminé

<sup>h</sup> Dernière urine précédant la préparation et l'application de perméthrine

<sup>i</sup> La superviseur

<sup>j</sup> Les 10 cueilleurs

<sup>k</sup> LOD = limite de détection

La plupart des travailleurs présentaient des concentrations de métabolites pré- et post-exposition très semblables (voir tableau 1). Plusieurs facteurs peuvent expliquer cela. Premièrement, l'exposition documentée ici concerne uniquement la perméthrine. Puisque de nombreux autres pyréthrinoïdes produisent les mêmes métabolites, les concentrations mesurées avant l'exposition à la perméthrine (pré-exposition) ont pu être influencées par une exposition à d'autres insecticides comme la lambda-cyhalothrine ou la cyperméthrine (Leng *et al.*, 2003; Woollen *et al.*, 1992). Si cette autre exposition est beaucoup plus importante que celle due au travail dans un champ traité à la perméthrine, il est normal que les données pré- et post-exposition donnent sensiblement les mêmes valeurs. Toutefois, une étude a montré que l'alimentation serait la principale source d'exposition dans la population générale (Schettgen *et al.*, 2002). Ainsi, il est possible qu'une large part du niveau d'exposition soit causée par l'alimentation et non par une tâche reliée au travail.

Il faut aussi différencier l'utilisation de la moyenne géométrique et du maximum pour représenter les valeurs de post-exposition. Dans le cas des travailleurs ayant un seul pic important comme pour l'applicateur, l'utilisation de la moyenne géométrique de toutes les valeurs post-exposition n'est pas représentative de l'impact du travail sur l'exposition globale. En effet, le pic causé par l'exposition se fond dans la masse des autres urines collectées. Par exemple, l'applicateur présente une concentration de 3-PBA de 0,15  $\mu\text{mol/mol}$  de créatinine en pré-exposition à la perméthrine et de 0,14  $\mu\text{mol/mol}$  de créatinine en post-exposition. Les deux valeurs sont très près l'une de l'autre. Cependant, l'applicateur a atteint un pic de 1,82  $\mu\text{mol/mol}$  de créatinine suite à son exposition à la

perméthrine. Cette valeur est 10 fois plus élevée que celle de pré-exposition. Pour d'autres travailleurs comme le cueilleur T57 qui n'ont pas de pic majeur, l'utilisation du maximum n'est pas nécessaire. La moyenne géométrique représente beaucoup mieux l'exposition globale du travailleur. Pour ce travailleur, à la fois la moyenne géométrique et le maximum ont des valeurs en dessous de celles obtenues en pré-exposition. Son travail dans un champ traité ne serait donc pas sa source d'exposition principale. Il aurait été exposé avant le début de cette étude, soit par l'alimentation ou bien lors de l'accomplissement d'autres tâches comme le nettoyage ou le ramassage du matériel utilisé. De plus, il a été rapporté que de la lambda-cyhalothrine avait été utilisée dans plusieurs champs avant le début de cette étude. Les valeurs de pré-exposition pourraient ainsi refléter l'exposition du travailleur à la lambda-cyhalothrine.

### **3.3 Comparaison avec d'autres études**

Quelques études sur l'exposition aux pyréthrinoïdes ont été menées auprès de la population québécoise. Deux d'entre elles se sont concentrées sur la population générale. La première portait sur la population urbaine de Montréal (Fortin *et al.*, 2008), alors que la seconde portait sur la population rurale de la région de la Montérégie (Couture *et al.*, 2009).

Tableau II. Comparaison des taux d'excrétion de 3-PBA (pmol/h/kg pc) obtenus dans la présente étude avec ceux obtenus dans d'autres études menées dans la Province du Québec

Étude	Population	Concentrations de 3-PBA (pmol/h/kg pc)		
		Médiane	95 <sup>e</sup> centile	Maximum
Présente étude	Travailleurs agricoles	1,6	8,5	13,7
Fortin <i>et al.</i> (2008)	Population urbaine	0,7	13,0	45,4
Couture <i>et al.</i> (2009)	Population rurale	1,1	10,9	40,9
Ratelle <i>et al.</i> (2014b)	Travailleurs agricoles	1,5	ND	10,0

On peut remarquer que la médiane de la présente étude est plus du double de celle de la population urbaine (Fortin *et al.*, 2008). Quant à la médiane de la population rurale, bien que plus élevée que celle de la population urbaine, elle reste plus basse que celle de cette étude (Couture *et al.*, 2009). Cela tendrait à montrer que les travailleurs sont pour la plupart un peu plus exposés que la population générale.

Les maximums de concentrations de 3-PBA obtenus dans les deux études réalisées dans un groupe de la population générale du Québec sont environ trois fois plus élevés que le maximum atteint dans cette étude (voir tableau 2). Plusieurs facteurs peuvent expliquer cela. Un premier fait à noter est que les gens exposés au travail étaient exclus de l'étude de Fortin *et al.* (2008), mais pas de l'étude de Couture *et al.* (2009). Puisque les travailleurs tendraient à être plus exposés, le fait des les inclure dans une étude sur la population rurale pourrait causer une augmentation des niveaux d'exposition

observés. Un autre facteur à prendre en compte est l'utilisation domestique de perméthrine. Par exemple, cet insecticide se retrouve dans la fabrication de nombreux produits contre les poux (Tomalik-Scharte *et al.*, 2005). L'utilisation de shampoing contre les poux a justement été documentée dans l'étude de Fortin *et al.* (2008). La perméthrine peut aussi être utilisée par les exterminateurs comme c'est souvent le cas lors de problème de punaises de lit. Dans l'étude de Couture *et al.* (2009), quatre des participants ont eu recours à un exterminateur. L'étude de Hardt et Angerer (2003) a démontré que les exterminateurs étaient beaucoup plus exposés que la population générale. Le recours à un exterminateur pourrait donc expliquer que des participants montraient des concentrations maximales si élevées.

D'autres études dans le monde ont été menées sur l'exposition aux pyréthrinoïdes. En France, l'étude portait sur une population rurale disant n'avoir subi aucune exposition (Le Grand *et al.*, 2011). Des études de suivi biologique de l'exposition aux pyréthrinoïdes ont été menées chez des travailleurs en Allemagne, au Japon et en Thaïlande (Hardt et Angerer, 2003; Panuwet *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2007). Cependant, aucune de ces études ne ciblait la perméthrine spécifiquement.

Tableau III. Concentrations urinaires de 3-PBA ( $\mu\text{g/g}$  de créatinine) obtenues dans la présente étude comparées à celles obtenues dans plusieurs autres études à travers le monde

Étude	Pays	Population étudiée	Concentrations de 3-PBA ( $\mu\text{g/g}$ créat.)		
			Moyenne géométrique	Médiane	Maximum
Présente étude	Québec	Travailleurs	0,4	0,4	4,8
Le Grand <i>et al.</i> (2011)	France	Rurale	0,7	0,6	2,1
Hardt et Angerer (2003)	Allemagne	Travailleurs <sup>a</sup>	1,8	0,6	28,5
Wang <i>et al.</i> (2007)	Japon	Travailleurs <sup>b</sup>	12,2	ND	ND
Panuwet <i>et al.</i> (2008)	Thaïlande	Travailleurs	0,9	1.0	21,0

<sup>a</sup> Les données rapportées ici concernent uniquement les travailleurs agricoles

<sup>b</sup> Les données rapportées ici concernent uniquement la saison haute (été) de travail

Dans la présente étude, la moyenne géométrique et la médiane des concentrations de 3-PBA étaient plus faibles que celles des quatre autres études présentées. Ceci peut notamment s'expliquer par le fait que la concentration de pyréthriinoïdes dans la solution utilisée peut varier d'un endroit à l'autre. Par exemple, le Pounce 3.2 EC contient 38.4 % de perméthrine, alors que le Pounce 25 WP contient 25 % de perméthrine (FMC, 2008; U.S.EPA, 2012). De plus, la capacité de résistance des insectes influence la quantité et la diversité d'insecticides nécessaires pour protéger les cultures (Oerke et Dehne, 2004). Chaque région ayant ses parasites propres, la quantité de pyréthriinoïdes requise pour neutraliser la menace varie à travers le monde (FAO, 2005). Ainsi, une région ayant des insectes plus variés et plus résistants aura besoin d'utiliser plus de pesticides (Oerke et Dehne, 2004).

L'adoption de comportements sécuritaires sur les lieux de travail a un impact important sur le niveau d'exposition des travailleurs (Ye *et al.*, 2013). Ces comportements incluent le port d'équipement de protection individuelle (EPI), la prise d'une douche après le travail, le changement de vêtements entre les quarts de travail et le lavage fréquent des mains. L'EPI comprend l'utilisation de masques respiratoires, de lunettes de sécurité, de gants et de vêtements de protection cutanée (Ye *et al.*, 2013). Dans la présente étude, 11 travailleurs sur 12 portaient des gants et six sur 12 portaient des vêtements à manche longue durant leur tâche, mais aucun ne portait des vêtements de protection cutanée certifiés. L'opérateur a en plus porté un masque avec filtre durant la préparation de la solution et des lunettes durant le nettoyage de l'équipement. De plus, la plupart des travailleurs ont rapporté, dans le questionnaire quotidien, prendre une douche et changer de vêtements après chaque quart de travail. Bien que les travailleurs de cette étude ne portaient pas d'EPI à part des gants et, pour l'opérateur, un masque et des lunettes, leur niveau d'exposition est plus faible que celui documenté dans plusieurs autres études (voir tableau III). Cependant, il faut tenir en compte que les travailleurs de cette étude essayaient tout de même de réduire leur contact cutané par le port de gants et de vêtements longs. Baldi *et al.* (2002) ont obtenu des résultats mitigés sur l'efficacité du port d'équipement de protection. Certains travailleurs portant uniquement des vêtements de base (pantalon et chandail) ont été moins exposés que d'autres portant un équipement de protection certifié. Ils en ont conclu qu'une utilisation non appropriée de vêtement de protection peut augmenter le niveau d'exposition du travailleur.

### 3.4 Inscription de l'étude dans un projet plus vaste

L'étude détaillée dans ce mémoire fait partie de la dernière phase d'un projet ayant pour titre « Développement et application d'une approche pour l'évaluation de l'exposition des travailleurs agricoles aux pyréthrinoïdes ». Ce projet se divisait en trois grandes phases. La première consistait à mener une étude sur des volontaires afin de mieux connaître la toxicocinétique de la perméthrine et de la cyperméthrine. Au cours de la seconde phase, une modélisation toxicocinétique a été élaborée sur la base des données recueillies chez les volontaires. L'objectif était de bâtir un modèle permettant de prédire les doses absorbées dans des conditions réelles d'exposition. La troisième et dernière phase se concentrait sur les travailleurs. Dans cette phase, deux études ont été menées, l'une sur la perméthrine et l'autre sur la cyperméthrine (Ratelle *et al.*, 2014b).

Les deux études chez les travailleurs ont été menées dans la même population, soit les travailleurs agricoles de la Montérégie. La méthodologie utilisée était sensiblement la même pour les deux études. Le but principal était d'émettre des recommandations afin d'améliorer la surveillance biologique des pyréthrinoïdes. Même si les deux études avaient le même objectif principal, elles ont ciblé des points différents pour l'atteindre. L'étude sur l'exposition à la cyperméthrine s'est concentrée sur les variations intra- et inter-sujets, alors que celle sur l'exposition à la perméthrine s'est concentrée sur les profils cinétiques. Le nombre de participants étant plus élevé dans la première étude, des analyses statistiques ainsi qu'une simulation Monte-Carlo ont pu être menées. Dans la seconde étude, les différents types de profils cinétiques ont été détaillés et les doses absorbées ont été reconstruites grâce à un modèle toxicocinétique (Côté *et al.*, 2014).

Pour ce qui est des résultats, la seconde étude a montré des niveaux d'expositions légèrement supérieurs à ceux de la première étude (voir tableau 2). Les deux études proposent des recommandations de surveillance biologique semblables, soit la collecte d'un minimum de trois urines en série: une première urine avant le début du travail dans une zone traitée ou d'épandage, une seconde urine à la fin de la première journée d'exposition et une troisième le lendemain matin.

L'étude de la toxicocinétique a aidé à mieux comprendre la signification d'une mesure à un moment donné surtout pour les travailleurs ayant un ou plusieurs pics importants. Le profil cinétique de l'applicateur montre un pic unique environ 30 h après le début d'une exposition de 3.5 h à la perméthrine. Le temps de demi-vie d'élimination apparente était de 6.4 h pour le *trans*-DCCA et de 8.7 h pour le 3-PBA. La comparaison de ces valeurs avec celles obtenues lors d'études de volontaires exposés par voie orale ou par voie cutanée a permis de déterminer la voie d'exposition de ce travailleur (Ratelle *et al.*, 2014a; Tomalik-Scharte *et al.*, 2005). Même si le moment du pic d'excrétion est plus compatible avec une exposition cutanée, le temps de demi-vie apparente pointe plutôt vers une exposition orale. Selon toute vraisemblance, cet applicateur a été exposé indirectement par contact main-bouche après un contact non protégé avec des surfaces ou des vêtements contaminés ou par des pratiques d'hygiène insuffisantes (HSE, 2007). Le profil cinétique du superviseur est compatible avec une co-exposition à de multiples pyréthriinoïdes durant les premières 24 h de la collecte. Le pic de 3-PBA observé au début de la collecte ne peut pas être attribué à la perméthrine, puisque les travailleurs n'étaient encore entrés dans une zone traitée. Cependant, le superviseur a rapporté que de la

lambda-cyhalothrine avait été utilisée dans un champ adjacent. La demi-vie d'élimination apparente est de 17 h pour le 3-PBA et de 11 h pour le *trans*-DCCA ce qui est trop long pour une exposition aiguë orale ou respiratoire (Côté *et al.*, 2014; Leng *et al.*, 1997b; Ratelle *et al.*, 2014a). Il est donc plausible que ce travailleur ait été exposé par la voie cutanée. Le profil cinétique de l'un des cueilleurs (T60) montre deux pics majeurs durant les trois jours qu'a duré la collecte. L'augmentation initiale des valeurs d'excrétion s'est produite avant le début du travail dans le champ traité à la perméthrine. De plus, le profil du *trans*-DCCA ne suivait pas celui du 3-PBA; il est plutôt resté à un niveau constant faible. Comme pour le superviseur, une co-exposition à la lambda-cyhalothrine serait donc probable. Dans le cas des autres travailleurs, l'étude de leur profil cinétique a permis de déterminer leur niveau d'exposition de base. Cependant, vu les faibles variations, il n'est pas possible de relier le niveau d'exposition avec une tâche ou une activité en particulier.

En termes de stratégies d'échantillonnage pour un suivi de surveillance biologique en routine, les données obtenues dans cette étude indiquent que la fréquence de collecte doit être adaptée en fonction du type d'exposition. L'analyse des profils cinétiques des cueilleurs (données non présentées) a permis de déterminer que les travailleurs qui sont exposés tous les jours ont peu de variabilité dans leur niveau d'excrétion de métabolites urinaires. Ainsi, pour les travailleurs appelés à travailler quotidiennement pendant toute la période estivale dans des zones traitées à répétition avec des formulations à base de pyréthriinoïdes/perméthrine une collecte ponctuelle aléatoire durant la période d'application de pesticides serait suffisante pour obtenir une vue globale du niveau

d'exposition de ces travailleurs. Ratelle *et al.* (2014b) a utilisé une simulation Monte Carlo pour calculer la variation inter-sujet dans les concentrations des métabolites urinaires sur la base d'une sélection itérative aléatoire. Pour ce faire, les auteurs ont choisi aléatoirement une urine par travailleur, puis ils ont calculé la moyenne géométrique pour les 34 valeurs ainsi obtenues. Après 100 000 itérations successives, ils ont obtenu une variation des valeurs moyennes de 5 à 7 fois. Ainsi, la sélection aléatoire d'une mesure unique contrait en partie l'impact de la variation dans les concentrations d'une collecte urinaire à l'autre chez un même individu sur la tendance centrale dans les moyennes d'excrétion au sein d'un groupe d'individus. Donc, l'utilisation de collecte ponctuelle au sein d'un grand groupe de travailleurs ne permettrait pas de connaître précisément le niveau d'exposition de chacun de ces travailleurs, mais permettrait d'avoir une vue d'ensemble pour le groupe.

À l'opposé, pour caractériser correctement le niveau d'exposition de travailleurs exposés de façon plus sporadique comme les applicateurs, l'utilisation de plusieurs urines en série est indispensable. De plus, le moment de la collecte doit être choisi avec soin afin d'obtenir des informations adéquates sur les pics d'excrétion. Les recommandations de surveillance biologique en routine émises dans la présente étude, soit la collecte de trois urines en série, ciblent en particulier ces travailleurs. Malgré la connaissance de profil détaillé, certaines incertitudes demeurent pour un suivi biologique optimal en routine. Le moment du pic varie beaucoup entre les personnes et selon la voie d'exposition (Ratelle *et al.*, 2014a, 2014b; Tomalik-Scharte *et al.*, 2005; Woollen *et al.*, 1992). Il est donc difficile de cibler le moment adéquat pour obtenir les valeurs maximales d'exposition du

travailleur. Cependant, la collecte de trois urines sur 24 h devrait pallier en partie à ce problème.

Ce vaste projet a permis de dresser les profils cinétiques d'exposition pour des travailleurs agricoles. Cependant, plusieurs autres travailleurs, comme les exterminateurs, sont exposés professionnellement à la perméthrine. Il pourrait être intéressant, dans le cadre d'un autre projet, de documenter leur exposition en utilisant les recommandations émises dans ce mémoire. Cela permettrait de valider l'approche recommandée dans la présente étude et de déterminer si cette approche peut être généralisée à d'autres groupes de travailleurs.

## 4. Conclusion

En conclusion, cette étude a permis de construire les profils cinétiques de plusieurs travailleurs agricoles dans des conditions réelles d'exposition afin de pouvoir émettre des recommandations pour une meilleure surveillance biologique en routine. Deux métabolites majeurs de la perméthrine, le *trans*-DCCA et le 3-PBA, ont servi à dresser les profils cinétiques. Le profil de l'apporteur montre un important pic représentatif d'une exposition aiguë unique durant la période de biosurveillance, alors que les profils de la superviseuse et des cueilleurs montrent plusieurs petits pics représentatifs d'une exposition répétée. En plus des profils cinétiques, d'autres éléments ont été analysés. Premièrement, la dose absorbée quotidiennement a été reconstruite pour chacun des travailleurs et a été comparée avec une dose de référence biologique (BRV). Tous les travailleurs avaient des doses absorbées reconstruites sous la valeur de référence biologique. Le superviseur, avec une fraction de la BRV de 0,6, était le travailleur ayant absorbé le plus de perméthrine. De plus, la variabilité dans les concentrations urinaires et dans les taux d'excrétion des métabolites a été calculée. La variabilité intra-sujet a servi pour comparer ces deux types d'unité. Cela a permis d'établir que la concentration ajustée à la créatinine pourrait être une unité plus adaptée pour la surveillance biologique de la perméthrine que le taux d'excrétion. Suite à l'analyse des profils obtenus dans cette étude, il a été recommandé de collecter un minimum de trois urines par travailleur : une première urine avant le début de l'exposition, une seconde urine à la fin de la première journée de travail suivant le début de l'exposition et une troisième urine le lendemain matin. Ces recommandations pourraient donc servir lors d'enquêtes de surveillance

biologique en routine sur les niveaux d'exposition chez divers travailleurs, par exemple les exterminateurs ou les serriculteurs.

## Bibliographie

- 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.
- Aktar, M. W., Sengupta, D., & Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdiscip Toxicol*, 2(1), 1-12.
- Anadon, A., Martinez-Larranaga, M. R., Diaz, M. J., & Bringas, P. (1991). Toxicokinetics of permethrin in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol*, 110(1), 1-8.
- Arcury, T. A., Quandt, S. A., Barr, D. B., Hoppin, J. A., McCauley, L., Grzywacz, J. G., et al. (2006). Farmworker exposure to pesticides: methodologic issues for the collection of comparable data. *Environ Health Perspect*, 114(6), 923-928.
- Barr, D. B., Olsson, A. O., Wong, L. Y., Udunka, S., Baker, S. E., Whitehead, R. D., et al. (2010). Urinary concentrations of metabolites of pyrethroid insecticides in the general U.S. population: National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2002. *Environ Health Perspect*, 118(6), 742-748.
- Barr, D. B., Thomas, K., Curwin, B., Landsittel, D., Raymer, J., Lu, C., et al. (2006). Biomonitoring of exposure in farmworker studies. *Environ Health Perspect*, 114(6), 936-942.
- Berger-Preiss, E., Levsen, K., Leng, G., Idel, H., Sugiri, D., & Ranft, U. (2002). Indoor pyrethroid exposure in homes with woollen textile floor coverings. *Int J Hyg Environ Health*, 205(6), 459-472.
- Berthet, A., Heredia-Ortiz, R., Vernez, D., Danuser, B., & Bouchard, M. (2012). A detailed urinary excretion time course study of captan and folpet biomarkers in workers for the estimation of dose, main route-of-entry and most appropriate sampling and analysis strategies. *Ann Occup Hyg*, 56(7), 815-828.
- Boeniger, M. F., Lowry, L. K., & Rosenberg, J. (1993). Interpretation of urine results used to assess chemical exposure with emphasis on creatinine adjustments: a review. *Am Ind Hyg Assoc J*, 54(10), 615-627.
- Bouchard, M., Carrier, G., & Brunet, R. C. (2008). Assessment of absorbed doses of carbaryl and associated health risks in a group of horticultural greenhouse workers. *Int Arch Occup Environ Health*, 81(3), 355-370.

- Bouchard, M., Carrier, G., Brunet, R. C., Dumas, P., & Noisel, N. (2006). Biological monitoring of exposure to organophosphorus insecticides in a group of horticultural greenhouse workers. *Ann Occup Hyg*, 50(5), 505-515.
- Bouchard, M., Gosselin, N. H., Brunet, R. C., Samuel, O., Dumoulin, M. J., & Carrier, G. (2003). A toxicokinetic model of malathion and its metabolites as a tool to assess human exposure and risk through measurements of urinary biomarkers. *Toxicol Sci*, 73(1), 182-194.
- Bradberry, S. M., Cage, S. A., Proudfoot, A. T., & Vale, J. A. (2005). Poisoning due to pyrethroids. *Toxicol Rev*, 24(2), 93-106.
- Brammer, A. (1989). Permethrin: 4-hour acute inhalation toxicity study in the rat: Imperial chemical industries Ltd.
- Canada, S. (2007). *Pesticides et Santé*. (978-0-662-73230-3). Retrieved from [http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/alt\\_formats/hecs-sesc/pdf/pubs/contaminants/pesticides-fra.pdf](http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/alt_formats/hecs-sesc/pdf/pubs/contaminants/pesticides-fra.pdf).
- Cantalamesa, F. (1993). Acute toxicity of two pyrethroids, permethrin, and cypermethrin in neonatal and adult rats. *Arch Toxicol*, 67(7), 510-513.
- Casida, J. E. (1980). Pyrethrum flowers and pyrethroid insecticides. *Environ Health Perspect*, 34, 189-202.
- Casida, J. E., Ueda, K., Gaughan, L. T., & Soderlund, D. M. (1976). Structure-biodegradability relationships in pyrethroid insecticides. *Arch Environ Contam Toxicol*, 3, 491-500.
- CDC, C. f. D. C. a. P. (2009). Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals (pp. 163-166). online.
- CEPA. (1992). *Permethrin (Permanone tick repellent) risk characterization document*. Sacramento: California Environmental Protection Agency.
- Chen, H., Xiao, J., Hu, G., Zhou, J., Xiao, H., & Wang, X. (2002). Estrogenicity of organophosphorus and pyrethroid pesticides. *J Toxicol Environ Health A*, 65(19), 1419-1435.
- CHMS. (2013). *Second Report on Human Biomonitoring of Environmental Chemicals in Canada: Canadian Health Measures Survey (CHMS)-Cycle 2 (2009-2011)*.
- Clapp, M. J. L., Banham, P. B., Glaiser, J. R., & Moyes, A. (1977). PP557: 28 days feeding study in mice: Imperial chemical industries Ltd.
- Clark, D. G. (1978). Toxicology of WL43479: Acute toxicity of WL43479: Shell Research Ltd.
- Côté, J., Bonvalot, Y., Carrier, G., Lapointe, C., Fuhr, U., Tomalik-Scharte, D., et al. (2014). A novel toxicokinetic modeling of cypermethrin and permethrin and their metabolites in humans for dose reconstruction from biomarker data. *PLoS One*, 9(2), e88517.

- Couture, C., Fortin, M. C., Carrier, G., Dumas, P., Tremblay, C., & Bouchard, M. (2009). Assessment of exposure to pyrethroids and pyrethrins in a rural population of the Monteregie area, Quebec, Canada. *J Occup Environ Hyg*, 6(6), 341-352.
- Crawford, M. J., Croucher, A., & Hutson, D. H. (1981). Metabolism of cis- and trans-cypermethrin in rats. Balance and tissue retention study. *J Agric Food Chem*, 29(1), 130-135.
- Crow, J. A., Borazjani, A., Potter, P. M., & Ross, M. K. (2007). Hydrolysis of pyrethroids by human and rat tissues: examination of intestinal, liver and serum carboxylesterases. *Toxicol Appl Pharmacol*, 221(1), 1-12.
- Dorman, D. C. (1990). Diethyltoluamide (DEET) insect repellent toxicosis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 20(2), 387-391.
- Doyle, R. D., Kaufman, D. D., Burt, G. W., & Douglass, L. (1981). Degradation of cis-permethrin in soil amended with sewage sludge or dairy manure. *J Agric Food Chem*, 29(4), 412-414.
- Emara, A. M., & Draz, E. I. (2007). Immunotoxicological study of one of the most common over-the-counter pyrethroid insecticide products in Egypt. *Inhal Toxicol*, 19(12), 997-1009.
- FAO. (2005, 26-28 July 2005). *Implementation, monitoring and observance of the International code of conduct on the distribution and use of pesticides*. Paper presented at the Asia Regional Workshop, Bangkok, Thailand.
- Farquhar, J. A., Hutchinson, D. B. A., Periam, A. W., & Sparks, R. G. (1981). An investigation into the absorption of permethrin from impregnated clothing: Wellcome research laboratories.
- FMC. (2008). Pounce 25 WP. In A. P. Group (Ed.), (Vol. EPA Reg. No. 279-3051). Philadelphia.
- Formoli, T. A. (1992). *Estimation of exposure of persons in California from special local need use of permethrin on human clothing*. Sacramento: Retrieved from [http://www.cdpr.ca.gov/docs/risk/rcd/permet\\_s3.pdf](http://www.cdpr.ca.gov/docs/risk/rcd/permet_s3.pdf).
- Fortin, M. C., Bouchard, M., Carrier, G., & Dumas, P. (2008). Biological monitoring of exposure to pyrethrins and pyrethroids in a metropolitan population of the Province of Quebec, Canada. *Environ Res*, 107(3), 343-350.
- Garey, J., & Wolff, M. S. (1998). Estrogenic and antiprogesterone activities of pyrethroid insecticides. *Biochem Biophys Res Commun*, 251(3), 855-859.
- Gaughan, L. C., Unai, T., & Casida, J. E. (1976). Permethrin metabolism in rats. *J Agric Food Chem*, 25(1), 9-17.

- Go, V., Garey, J., Wolff, M. S., & Pogo, B. G. (1999). Estrogenic potential of certain pyrethroid compounds in the MCF-7 human breast carcinoma cell line. *Environ Health Perspect*, *107*(3), 173-177.
- Godin, S. J., Scollon, E. J., Hughes, M. F., Potter, P. M., DeVito, M. J., & Ross, M. K. (2006). Species differences in the in vitro metabolism of deltamethrin and esfenvalerate: differential oxidative and hydrolytic metabolism by humans and rats. *Drug Metab Dispos*, *34*(10), 1764-1771.
- Gorse, I., & Balg, C. (2014). *Bilan des ventes de pesticides au Québec*. Web: Retrieved from <http://www.mddelcc.gouv.qc.ca/pesticides/bilan/bilan2011.pdf>.
- Gotoh, Y., Kawakami, M., Matsumoto, N., & Okada, Y. (1998). Permethrin emulsion ingestion: Clinical manifestations and clearance of isomers. *Journal of toxicology clinical toxicology*, *36*, 57-61.
- Hadnagy, W., Leng, G., Sugiri, D., Ranft, U., & 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.
- Hardt, J., & Angerer, J. (2003). Biological monitoring of workers after the application of insecticidal pyrethroids. *Int Arch Occup Environ Health*, *76*(7), 492-498.
- Heudorf, U., & Angerer, J. (2001). Metabolites of pyrethroid insecticides in urine specimens: current exposure in an urban population in Germany. *Environ Health Perspect*, *109*(3), 213-217.
- Holcombe, G. W., Phipps, G. L., & Tanner, D. K. (1982). The acute toxicity of kelthane, dursban, disulfoton, pydrin, and permethrin to fathead minnows *Pimephales promelas* and rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological*, *29*(3), 167-178.
- HSE. (2007). Inadvertent ingestion exposure in the workplace. Research Park North, Riccarton, Edinburgh: Institute for Occupational Medicine, Health and Safety Executive (HSE).
- Hutson, D. H. (1979). The metabolic fate of synthetic pyrethroid insecticides in mammals. *Prog. Drug Metab.*, *3*, 215-252.
- Jagers, S. E., & Parkinson, G. R. (1979). Summary and review of acute toxicities in laboratory species: Imperial chemical industries Ltd.
- JMPR. (1987). Permethrin (Pesticide residues in food: 1987 evaluations part II toxicology. Rome: Joint Meeting of the FAO panel of experts on pesticide residues in food and the environment and the WHO core assessment group.

- JMPR. (2002). Pesticide residues in food (pp. 10). Rome: Joint Meeting of the FAO panel of experts on pesticide residues in food and the environment and the WHO core assessment group.
- Julien, R., Adamkiewicz, G., Levy, J. I., Bennett, D., Nishioka, M., & Spengler, J. D. (2008). Pesticide loadings of select organophosphate and pyrethroid pesticides in urban public housing. *J Expo Sci Environ Epidemiol*, 18(2), 167-174.
- Kaneko, H. (2010). Pyrethroid chemistry and metabolism *Kriedger, R. (Eds), Hayes Handbook of pesticide toxicology* (pp. 1635-1663): Academic Press.
- Kaneko, H. (2011). Pyrethroids: mammalian metabolism and toxicity. *J Agric Food Chem*, 59(7), 2786-2791.
- Kaneko, H., & Miyamoto, J. (2001). Pyrethroid chemistry and metabolism. *Handbook of Pesticide Toxicology*, 1263-1288.
- Kaufman, D. D., Hayes, S. C., Jordan, E. G., & Kayser, A. J. (1977). Permethrin degradation in soil and microbial cultures. In A. C. Society (Ed.), *Synthetic pyrethroids* (pp. 147-161). Washington, DC: ACS symposium.
- Killeen, J. C., & Rapp, W. R. (1976). A three month oral toxicity study of FMC 33297 in beagle dogs: Bio-Dynamics Inc.
- Kim, S. S., Lee, R. D., Lim, K. J., Kwack, S. J., Rhee, G. S., & Sack, J. H. (2004). Potential estrogenic and antiandrogenic effects of permethrin in rats. *J Reprod Dev*, 51(2), 201-210.
- Klaassen, C. D. (2001). *Casarett and Doull's toxicology : The basic science of poisons* (Vol. 6th edition). NY: McGraw-Hill.
- Kohda, H., Kadota, T., & Miyamoto, J. (1979). Acute oral, dermal and subcutaneous toxicities of permethrin in rats and mice: Sumitomo chemical Co.
- Kolaczinski, J. H., & Curtis, C. F. (2004). Chronic illness as a result of low-level exposure to synthetic pyrethroid insecticides: a review of the debate. *Food and Chemical Toxicology*, 42, 697-706.
- Le Grand, R., Dulaurent, S., Gaulier, J. M., Saint-Marcoux, F., Moesch, C., & Lachatre, G. (2011). Simultaneous determination of five synthetic pyrethroid metabolites in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to 39 persons without known exposure to pyrethroids. *Toxicol Lett*, 210(2), 248-253.
- Leng, G., Kuhn, K. H., & Idel, H. (1996). Biological monitoring of pyrethroid metabolites in urine of pest control operators. *Toxicol Lett*, 88(1-3), 215-220.

- Leng, G., Kuhn, K. H., & Idel, H. (1997a). Biological monitoring of pyrethroids in blood and pyrethroid metabolites in urine: applications and limitations. *Sci Total Environ*, 199(1-2), 173-181.
- Leng, G., Leng, A., Kuhn, K. H., Lewalter, J., & Pauluhn, J. (1997b). Human dose-excretion studies with the pyrethroid insecticide cyfluthrin: urinary metabolite profile following inhalation. *Xenobiotica*, 27(12), 1273-1283.
- Leng, G., & Lewalter, J. (1999). Role of individual susceptibility in risk assessment of pesticides. *Occup Environ Med*, 56(7), 449-453.
- Leng, G., Ranft, U., Sugiri, D., Hadnagy, W., Berger-Preiss, E., & Idel, H. (2003). Pyrethroids used indoors--biological monitoring of exposure to pyrethroids following an indoor pest control operation. *Int J Hyg Environ Health*, 206(2), 85-92.
- MAPAQ. (2012). *L'emploi bioalimentaire*. Government of Quebec website: Retrieved from <http://www.mapaq.gouv.qc.ca/Fr/Productions/md/statistiques/emploi/pages/emploi.aspx>.
- Metker, L. W., Angerhofer, R. A., Pope, C. R., & Swentzel, K. C. (1977). Toxicology evaluation of 3-(phenoxyphenyl)methyl(+)-cis,trans-3-(2,2-dichloroethenyl)-2,2-demethylcyclopropanecarboxylate (permethrin) Edgewood, Md.: U.S. Army environmental hygiene agency.
- Ministère de l'Environnement, Q. (2002). Répertoire des principaux pesticides utilisés au Québec (pp. 476). Sainte-Foy.
- Morgan, M. K., Sheldon, L. S., Croghan, C. W., Jones, P. A., Chuang, J. C., & Wilson, N. K. (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), 266-274.
- Nelson, D. C. (1989). *Studies on the combined toxicity of DEET and permethrin*.
- NHANES. (2009). Fourth national report on human exposure to environmental chemicals. National Health and Nutrition Examination Survey (pp. 529). Atlanta, GA.
- Nishi, K., Huang, H., Kamita, S. G., Kim, I.-H., Morisseau, C., & Hammock, B. D. (2006). Characterization of pyrethroid hydrolysis by the human liver carboxylesterases hCE-1 and hCE-2. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 445, 115-123.
- NRC. (1994). *Health Effects of Permethrin-Impregnated Army Battle-Dress Uniforms*. Washington D.C.: National Academy Press.
- Oerke, E.-C., & Dehne, H.-W. (2004). Safeguarding production—losses in major crops and the role of crop protection. *Crop Protection*, 23, 275-285.

- Ohshima, M., Takimoto, Y., & Matsuda, T. (1988). *Accumulation and metabolism of 14 C-permethrin in carp (Cyprinus carpio)*. Sumitomo Chemical Co.
- Oulhote, Y., & Bouchard, M. F. (2013). Urinary metabolites of organophosphate and pyrethroid pesticides and behavioral problems in Canadian children. *Environ Health Perspect*, *121*(11-12), 1378-1384.
- Panuwet, P., Prapamontol, T., Chantara, S., Thavornnyuthikarn, P., Montesano, M. A., Whitehead, R. D., Jr., *et al.* (2008). Concentrations of urinary pesticide metabolites in small-scale farmers in Chiang Mai Province, Thailand. *Sci Total Environ*, *407*(1), 655-668.
- Parkinson, G. R. (1978). Permethrin: Acute toxicity to male rats: Imperial chemical industries Ltd.
- PMRA. (2008). Pounce (pp. 24): Agri-reseau.
- Ratelle, M., Côté, J., & Bouchard, M. (2014a). Toxicokinetics of permethrin biomarkers of exposure in orally exposed volunteers.
- Ratelle, M., Côté, J., & Bouchard, M. (2014b). Within and between-subject variability assessed from time courses of pyrethroid biomarkers of exposure in a group of agricultural workers in Quebec, Canada. *Int J Hyg Environ Health*.
- Riederer, A. M., Pearson, M. A., & Lu, C. (2011). Dietary patterns among the Metro Atlanta Cohort: implications for population-based longitudinal dietary pesticide exposure and risk assessment. *J Expo Sci Environ Epidemiol*, *21*(2), 142-149.
- Robinson, P. (1989). Permethrin: Acute dermal toxicity to the rat: Imperial chemical industries Ltd.
- Ross, M. K., Borazjani, A., Edwards, C. C., & Potter, P. M. (2006). Hydrolytic metabolism of pyrethroids by human and other mammalian carboxylesterases. *Biochem Pharmacol*, *71*(5), 657-669.
- Saito, K., Tomigahara, Y., Ohe, N., Isobe, N., Nakatsuka, I., & Kaneko, H. (2000). Lack of significant estrogenic or antiestrogenic activity of pyrethroid insecticides in three in vitro assays based on classic estrogen receptor alpha-mediated mechanisms. *Toxicol Sci*, *57*(1), 54-60.
- Sasinovich, L. M., & Panshina, T. N. (1987). Substantiation of hygienic rules for synthetic pyrethroid content in the work zone air. *Gig. Tr. Prof. Zabol.*, *8*, 48-50.
- Sassine, A., Moura, S., Leo, V. M., & Bustillos, O. V. (2004). Cypermethrin residues determination in the milk of a lactating dairy cow by gas chromatography-ion trap mass spectrometry. *J Anal Toxicol*, *28*(4), 238-241.

- Schettgen, T., Heudorf, U., Drexler, H., & Angerer, J. (2002). Pyrethroid exposure of the general population-is this due to diet. *Toxicol Lett*, *134*(1-3), 141-145.
- Scollon, E. J., Starr, J. M., Godin, S. J., DeVito, M. J., & Hughes, M. F. (2009). In vitro metabolism of pyrethroid pesticides by rat and human hepatic microsomes and cytochrome p450 isoforms. *Drug Metab Dispos*, *37*(1), 221-228.
- Shah, P. V., Fisher, H. L., Sumler, M. R., Monroe, R. J., Chernoff, N., & Hall, L. L. (1987). Comparison of the penetration of 14 pesticides through the skin of young and adult rats. *J Toxicol Environ Health*, *21*(3), 353-366.
- Sharom, M. S., & Solomon, K. R. (1981). Adsorption-desorption, degradation, and distribution of permethrin in aqueous systems. *J Agric Food Chem*, *29*, 1122-1125.
- Sidon, E. W., Moody, R. P., & Franklin, C. A. (1988). Percutaneous absorption of cis- and trans-permethrin in rhesus monkeys and rats: anatomic site and interspecies variation. *J Toxicol Environ Health*, *23*(2), 207-216.
- Smolders, R., Schramm, K. W., Nickmilder, M., & Schoeters, G. (2009). Applicability of non-invasively collected matrices for human biomonitoring. *Environ Health*, *8*, 8.
- Soderlund, D. M., Clark, J. M., Sheets, L. P., Mullin, L. S., Piccirillo, V. J., Sargent, D., et al. (2002). Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*, *171*(1), 3-59.
- Steen, H., Kuster, B., & Mann, M. (2001). Quadrupole time-of-flight versus triple-quadrupole mass spectrometry for the determination of phosphopeptides by precursor ion scanning. *J Mass Spectrom*, *36*(7), 782-790.
- Tomalik-Scharte, D., Lazar, A., Meins, J., Bastian, B., Ihrig, M., Wachall, B., et al. (2005). Dermal absorption of permethrin following topical administration. *Eur J Clin Pharmacol*, *61*(5-6), 399-404.
- Tornero-Velez, R., Davis, J., Scollon, E. J., Starr, J. M., Setzer, R. W., Goldsmith, M. R., et al. (2012). A pharmacokinetic model of cis- and trans-permethrin disposition in rats and humans with aggregate exposure application. *Toxicol Sci*, *130*(1), 33-47.
- Tyler, C. R., Jobling, S., & Sumpter, J. P. (1998). Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence. *Crit Rev Toxicol*, *28*(4), 319-361.
- U.S.EPA. (2006). *Reregistration eligibility decision (RED) for piperonyl butoxide (PBO)*. (EPA 738-R-06-005). Web: Retrieved from [http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/REDs/piperonyl\\_red.pdf](http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/REDs/piperonyl_red.pdf).

- U.S.EPA. (2009). *Reregistration Eligibility Decision (RED) for Permethrin*. (EPA 738-R-09-306). web: Retrieved from <http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/REDS/permethrin-red-revised-may2009.pdf>.
- U.S.EPA. (2012). Pounce 3.2 EC (pp. 13). Philadelphia: Agricultural Products Group.
- Vermeulen, R., Stewart, P., & Kromhout, H. (2002). Dermal exposure assessment in occupational epidemiologic research. *Scand J Work Environ Health*, 28(6), 371-385.
- Viau, C., Lafontaine, M., & Payan, J. P. (2004). Creatinine normalization in biological monitoring revisited: the case of 1-hydroxypyrene. *Int Arch Occup Environ Health*, 77(3), 177-185.
- Wallwork, L. M., Poll, G. S., & Malone, J. C. (1975). Effect on the rat oral toxicity of changes in the cis/trans with 21Z73 (NRDC 143) series: Wellcome research laboratories.
- Wang, D., Kamijima, M., Imai, R., Suzuki, T., Kameda, Y., Asai, K., *et al.* (2007). Biological monitoring of pyrethroid exposure of pest control workers in Japan. *J Occup Health*, 49(6), 509-514.
- WHO. (1990). *Permethrin Environmental Health Criteria 94*. Geneva.
- WHO. (2009). Who specifications and evaluations for public health pesticides *Permethrin* (pp. 22).
- Woollen, B. H., Marsh, J. R., Laird, W. J., & Lesser, J. E. (1992). The metabolism of cypermethrin in man: differences in urinary metabolite profiles following oral and dermal administration. *Xenobiotica*, 22(8), 983-991.
- Ye, M., Beach, J., Martin, J. W., & Senthilselvan, A. (2013). Occupational pesticide exposures and respiratory health. *Int J Environ Res Public Health*, 10(12), 6442-6471.
- Zhao, M., Chen, F., Wang, C., Zhang, Q., Gan, J., & Liu, W. (2010). Integrative assessment of enantioselectivity in endocrine disruption and immunotoxicity of synthetic pyrethroids. *Environ Pollut*, 158(5), 1968-1973.
- Zou, E., Hatakeyama, M., & Matsumura, F. (2002). Foci formation of MCF7 cells as an in vitro screening method for estrogenic chemicals. *Environ Toxicol Pharmacol*, 11(2), 71-77.

