

Université de Montréal

**Étude de la cinétique des pesticides pyréthrinoïdes en conditions  
contrôlées et en milieu de travail dans un objectif de  
biosurveillance**

par

Mylène Ratelle

Département de santé environnementale et santé au travail  
École de santé publique  
En collaboration avec la Faculté de Médecine

Thèse présentée à l'École de santé publique  
en vue de l'obtention du grade de doctorat  
en Santé publique  
option Toxicologie et analyse du risque

6 octobre 2014

© Mylène Ratelle, 2015



Université de Montréal

Cette thèse intitulée :

**Étude de la cinétique des pesticides pyréthrinoïdes en conditions contrôlées et en milieu  
de travail dans un objectif de biosurveillance**

Présentée par :

Mylène Ratelle

Département de santé environnementale et santé au travail

École de santé publique

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Michèle Bouchard, directrice de recherche

Dre Maryse Bouchard, président-rapporteur

Dre Geneviève Marchand, membre interne du jury

Dr Jonathan Chevrier, examinateur externe

Dr Gilles Bleau, représentant du doyen



## Résumé

Les pyréthriinoïdes sont des insecticides largement utilisés. La population générale y est exposée par l'alimentation tandis que les travailleurs agricoles y sont exposés lors de tâches diverses en champs. Leurs effets neurotoxiques, immunitaires et endocriniens potentiels en font des composés à surveiller pour assurer la santé de la population. La mesure de biomarqueurs d'exposition, qui consiste à quantifier la concentration dans l'organisme d'une substance ou de ses métabolites, permet d'estimer les doses absorbées. Les biomarqueurs peuvent également être des molécules répondant à un stress physiologique, identifiées comme des biomarqueurs d'effets. Pour raffiner les stratégies de biosurveillance de l'exposition, on se doit de bien connaître la toxicocinétique d'un xénobiotique; actuellement, les études de biosurveillance considèrent rarement la variabilité temporelle, intra-individuelle et inter-individuelle, qui pourrait influencer l'estimation de l'exposition. **L'objectif de la thèse est donc d'appliquer une approche cinétique pour l'évaluation de l'exposition aux pyréthriinoïdes en conditions contrôlées et en milieu de travail. Dans un volet exploratoire, l'effet de cette exposition sur des changements métaboliques précoces a également évalué.**

Trois métabolites finaux (*cis*-DCCA, *trans*-DCCA et 3-PBA) de deux pyréthriinoïdes les plus utilisés, soient la perméthrine et la cyperméthrine, ont été mesurés dans le plasma et l'urine de six volontaires oralement exposés à une dose équivalente à la dose de référence. Une demi-vie moyenne ( $t_{1/2}$ ) d'élimination apparente du *trans*-DCCA, *cis*-DCCA et 3-PBA dans le plasma de 5,1, 6,9 et 9,2 h, respectivement, a été obtenue après exposition orale à la cyperméthrine, comparativement à 7,1, 6,2 et 6,5 h après exposition à la perméthrine. Dans l'urine, la demi-vie d'élimination apparente ( $t_{1/2}$ ) était de 6,3, 6,4 et 6,4 h pour le *trans*-DCCA, *cis*-DCCA et 3-PBA, respectivement, après administration de la cyperméthrine comparé à 5,4, 4,5 et 5,7 h après administration de la perméthrine. Les profils temporels étaient semblables suite à l'exposition à la cyperméthrine et perméthrine.

Ensuite, une étude en milieu agricole a été réalisée avec la participation de travailleurs pour évaluer leur exposition et raffiner les stratégies de biosurveillance. La variabilité intra-

individuelle dans les niveaux de biomarqueurs d'exposition chez plusieurs travailleurs était plus importante que la variabilité inter-individuelle.

Les échantillons urinaires ont également été utilisés pour identifier des modifications du métabolome pouvant fournir de nouveaux biomarqueurs d'effets précoces. Chez les travailleurs, une augmentation de l'hippurate urinaire ( $p < 0,0001$ ) a été observée après exposition aux pyréthrinoïdes, un biomarqueur de la conjugaison de l'acide benzoïque.

En conclusion, cette étude a permis de mieux documenter la cinétique de biomarqueurs d'exposition aux pyréthrinoïdes dans des conditions contrôlées et réelles afin de raffiner les stratégies de biosurveillance. Elle a aussi contribué à renseigner sur les niveaux d'exposition agricole québécois et sur les paramètres professionnels associés à une plus forte exposition. Ce projet s'insère dans une démarche d'analyse de risque en santé au travail.

**Mots clés :** Pyréthrinoïde, biomarqueur, perméthrine, cyperméthrine, biosurveillance, DCCA, 3-PBA, toxicocinétique, analyse du risque, santé au travail, métabolomique

## Abstract

Pyrethroids are widely used insecticides. The general population is exposed to these compounds through the diet while agricultural workers are exposed during various tasks in the fields. Pyrethroids are compounds of interest given their neurotoxic, immune and endocrine disruptor effects; they should thus be monitored to ensure the health of the population. Measurement of biomarkers of exposure, which consists of quantifying concentrations of a substance or its metabolites in accessible biological matrices, allows estimating absorbed doses. Biomarkers can also be endogenous molecules that respond to a physiological stress and identified as biomarkers of effects. To refine biomonitoring of exposure strategies, one must be familiar with the toxicokinetics of xenobiotics; to date, biomonitoring studies rarely consider temporal variability, hence intra- and inter-individual variability, which may influence estimation of exposure. The aim of the thesis was to apply a kinetic approach for the assessment of exposure to pyrethroids in controlled conditions and in the workplace. In an ancillary study, the effect of pyrethroid exposure on early metabolic changes was also evaluated.

Three final metabolites (*cis*-DCCA, *trans*-DCCA and 3-PBA) of two of the most used pyrethroids, permethrin and cypermethrin, were measured in plasma and urine of six volunteers orally exposed to a dose similar to the reference dose, as analyzed by mass spectrometry. After oral exposure to cypermethrin, the mean apparent elimination half-life ( $t_{1/2}$ ) of *trans*-DCCA, *cis*-DCCA and 3-PBA in plasma was 5.1, 6.9 and 9.2 h, respectively, as compared to 7.1, 6.2 and 6.5 hours after permethrin exposure. In urine, the mean apparent elimination half-life ( $t_{1/2}$ ) of *trans*-DCCA, *cis*-DCCA and 3-PBA was 6.3, 6.4 and 6.4 h, respectively, after the administration of cypermethrin compared to 5.4, 4.5 and 5.7 h after permethrin exposure. The time profiles were similar following exposure to cypermethrin and permethrin. The data help to interpret the significance of biological measurements and optimal sampling strategies.

Later, a biomonitoring study in agricultural workers was conducted for the assessment of their exposure and refinement of biomonitoring strategies. Within-subject variability in biomonitoring data of several workers was more important than inter-subject variability.

Urine samples were also used to identify changes in the metabolome and hence potentially identify new biomarkers of early effects. In particular, an increased urinary excretion of hippurate ( $p < 0.0001$ ) was observed in workers exposed following an exposure episode to pyrethroid, a biomarker of the conjugation of benzoic acid.

In conclusion, this study allowed to better document the toxicokinetics of key biomarkers of exposure to pyrethroids, in order to refine biomonitoring of exposure strategies. It has also provided more information on agricultural exposure in Quebec workers and professional parameters associated with high exposure. This project is part of a risk assessment in occupational health.

**Keywords:** Pyrethroids, permethrin, cypermethrin, biomonitoring, DCCA, 3-PBA, toxicokinetics, risk assessment, occupational health, metabolomics







# Table des matières

Liste des tableaux .....	xvii
Liste des figures .....	xx
Abréviations .....	xxiii
Remerciements .....	xxvii
Préface .....	xxix
Avant-propos .....	xxx
La place de la santé environnementale et la santé au travail au sein de la santé publique .....	xxx
Le risque spécifique des travailleurs agricoles .....	xxx

<b>Chapitre 1</b> .....	1
INTRODUCTION .....	1
1. ÉTATS DES CONNAISSANCES .....	3
1.1. Les pesticides pyréthrinoïdes comme contaminants prioritaires .....	3
1.1.1. Historique de leur utilisation .....	3
1.1.2. Caractéristiques structurelles et physico-chimiques .....	4
1.1.3. Ampleur de leur utilisation dans la population générale .....	5
1.1.4. Milieu agricole et l'utilisation croissante de pyréthrinoïdes .....	8
1.2. Les voies d'exposition aux pyréthrinoïdes et l'estimation de l'exposition potentielle ..	11
1.2.1. L'exposition orale .....	11
1.2.2. L'exposition cutanée .....	12
1.2.3. L'exposition par inhalation .....	12
1.3. La toxicité générale des pyréthrinoïdes .....	14
1.3.1. Neurotoxicité et effets neurologiques .....	15
1.3.2. Immunotoxicité .....	17
1.3.3. Effets endocriniens et reproducteurs .....	17
1.3.4. Autres effets .....	19
1.4. Les pyréthrinoïdes les plus utilisés : la perméthrine et cyperméthrine .....	21

1.4.1. La perméthrine.....	21
1.4.2. La cyperméthrine.....	22
1.4.3. Les valeurs limites d'exposition actuelles en milieu de travail.....	23
1.5. La toxicocinétique comme étape critique au développement de biomarqueurs d'exposition.....	25
1.5.1. Absorption.....	25
1.5.2. Distribution.....	26
1.5.3. Métabolisme.....	26
1.5.4. Élimination.....	28
1.6. La biosurveillance de l'exposition.....	31
1.6.1. Principe.....	31
1.6.2. Biomarqueurs d'exposition à la perméthrine et cyperméthrine.....	32
1.6.3. Méthode analytique en spectrométrie de masse pour la quantification des métabolites de pyréthriinoïdes.....	34
1.6.4. Expression des données de surveillance biologique obtenues.....	35
1.6.5. Importance du profil temporel.....	36
1.6.6. Les niveaux de biomarqueurs d'exposition observés dans la population générale et les travailleurs.....	37
1.6.7. Biomarqueurs d'exposition et valeurs de référence biologiques.....	40
1.7. Biomarqueurs d'effets précoces et la métabolomique.....	42
1.8. Le projet de thèse.....	45
1.8.1. Originalité du projet.....	45
1.8.2. Objectifs.....	47
1.8.3. Hypothèses de recherche.....	48

## **Chapitre 2**..... 51

### MÉTHODE DE RECHERCHE..... 51

#### 2. MÉTHODOLOGIE..... 53

##### 2.1. Étude cinétique..... 53

###### 2.1.1. Méthode analytique en spectrométrie de masse pour la quantification des métabolites de pyréthriinoïdes..... 53

###### 2.1.2. Validation de la méthode..... 56

###### 2.1.3. Conception de l'étude cinétique des biomarqueurs chez des volontaires..... 57

2.1.4. Participants à l'étude clinique .....	58
2.1.5. Échantillonnage et dosage .....	59
2.1.6. Produits commerciaux utilisés .....	61
2.1.7. Traitement des échantillons .....	61
2.1.8. Analyse des échantillons .....	62
2.1.9. Analyse de la créatinine .....	63
2.1.10. Analyse toxicocinétique .....	63
2.1.11. Considérations éthiques .....	64
2.2. Étude de terrain chez des travailleurs .....	66
2.2.1. Conception de l'étude .....	66
2.2.2. Participants de l'étude en milieu de travail .....	66
2.2.3. Considérations éthiques .....	67
2.2.4. Échantillonnage urinaire chez les travailleurs .....	68
2.2.5. Produits commerciaux utilisés .....	68
2.2.6. Traitement des échantillons .....	68
2.2.7. Analyse des échantillons .....	69
2.2.8. Créatinine .....	70
2.2.9. Questionnaire .....	70
2.2.10. Analyse des profils temporels de biomarqueurs d'exposition chez les travailleurs .....	70
2.3. Contributions de l'étudiante .....	72

## **LES ARTICLES** .....

### **Chapitre 3** .....

Article 1: Toxicokinetics of permethrin biomarkers of exposure in orally exposed volunteers	77
Abstract .....	79
1. Introduction .....	80
2. Materials and methods .....	83
2.1. Study design .....	83
2.2. Subjects .....	83
2.3. Dosing and sampling .....	84

2.4. Chemicals and reagents .....	85
2.5. Urine and blood sample treatment.....	85
2.5.1. Analysis of <i>cis</i> -DCCA, <i>trans</i> -DCCA and 3-PBA in urine.....	85
2.5.2. Analysis of <i>cis</i> -DCCA, <i>trans</i> -DCCA and 3-PBA in plasma.....	86
2.6. UHPLC-MS-Q/TOF analysis .....	86
2.7. Toxicokinetic analysis .....	88
3. Results .....	89
3.1. Time courses of <i>cis</i> -DCCA, <i>trans</i> -DCCA and 3-PBA in plasma .....	89
3.2. Time courses of <i>cis</i> -DCCA, <i>trans</i> -DCCA and 3-PBA in urine.....	89
3.3. Comparison of plasma and urinary time courses.....	90
4. Discussion .....	91
Conflict of interest statement .....	94
Acknowledgements .....	94
References .....	95
Captions to figures .....	99

## **Chapitre 4** .....

Article 2: Time profiles and toxicokinetic parameters of key biomarkers of exposure to cypermethrin in orally exposed volunteers compared with previously available kinetic data following permethrin exposure.....	107
Abstract .....	109
1. Introduction .....	111
2. Materials and methods .....	113
2.1. Study design .....	113
2.2. Subjects.....	113
2.3. Dosing and sampling .....	114
2.4. Sample treatment and analysis .....	115
2.4.1. Chemicals and reagents.....	115
2.4.2. Blood and urine sample treatment .....	115
2.4.3. Blood and urine sample analysis.....	116
2.5. Toxicokinetic analysis .....	118
Results .....	119

3.1. Time courses of metabolites in plasma following cypermethrin exposure .....	119
3.2. Time courses of metabolites in urine following cypermethrin exposure .....	119
3.3. Comparison of metabolite times courses following cypermethrin and permethrin exposure.....	120
Discussion .....	121
Conflicts of interest statement.....	124
Acknowledgements .....	124
References .....	125
Captions to figures .....	130

## **Chapitre 5** .....

Article 3: Time courses and variability of pyrethroid biomarkers of exposure in a group of agricultural workers in Quebec, Canada.....	139
Abstract .....	141
2. Materials and methods .....	145
2.1. Studied workers .....	145
2.2. Urine sample collection .....	145
2.3. Treatment of urine samples and laboratory analysis .....	146
2.3.1. Chemicals and reagents.....	146
2.3.2. Working standard preparation and calibration curves .....	146
2.3.3. Extraction of <i>cis</i> and <i>trans</i> -DCCA and 3-PBA in urine.....	147
2.3.4. UHPLC-MS Q/TOF analysis of <i>cis</i> -DCCA, <i>trans</i> -DCCA and 3-PBA in urinary extracts .....	147
2.3.5. Creatinine correction.....	148
2.4. Questionnaire.....	149
2.5. Data analysis of the time course of exposure biomarkers .....	149
2.5.1. Analysis of the time courses of exposure biomarkers for each worker .....	149
2.5.2. Statistical analysis of determinants of urinary biomarker levels among workers considering repeated biological measurements.....	150
3. Results .....	152
3.1. Characteristics of the subjects and exposure conditions to cypermethrin .....	152

3.2. Time profiles of <i>trans</i> -DCCA, <i>cis</i> -DCCA and 3-PBA in the urine of exposed workers .....	153
3.3. Statistical assessment of predictors of elevated biomarkers of exposure between workers .....	154
4. Discussion .....	155
4.1. Time courses of <i>trans</i> -DCCA, <i>cis</i> -DCCA and 3-PBA in the urine of exposed workers .....	155
4.2. Within-subject variability in repeated biological measurements .....	156
4.3. Statistical analysis of predictors of elevated biomarkers of exposure between workers .....	157
4.4. Comparison of excretion values in workers biological reference values from other studies .....	158
4.5. Considerations for appropriate routine biomonitoring of workers exposure to cypermethrin and future perspectives .....	159
Conflicts of interest statement .....	161
Acknowledgements .....	161
References .....	162
Captions to figures .....	179

<b>Chapitre 6</b> .....	183
DISCUSSION SUR CE QU'APPORTE CETTE THÈSE .....	183
6. DISCUSSION .....	185
6.1. Connaissances scientifiques et atteinte des objectifs .....	185
6.1.1. Développement d'une méthode analytique en spectrométrie de masse comme outil efficace en biosurveillance .....	185
6.1.2. Étude clinique et toxicocinétique pour la perméthrine et cyperméthrine afin de combler des incertitudes scientifiques .....	190
6.1.3. L'intégration des paramètres toxicocinétiques pour la mesure de l'exposition en milieu professionnel .....	193
6.1.4. Les biomarqueurs d'effets précoces : résultats exploratoires métabolomiques précoces et effets rénaux potentiels .....	196
6.1.5. Avantage et limites de la recherche .....	197



6.2. Contribution du projet à l'interprétation des résultats de biosurveillance de l'exposition aux pyréthrinoïdes .....	198
6.2.1. Utilité des études toxicocinétiques en termes de biosurveillance individuelle .....	198
6.2.2. La biosurveillance individuelle afin de raffiner la biosurveillance populationnelle .....	199
6.3. Contribution en analyse et gestion du risque relié aux pyréthrinoïdes chez les travailleurs agricoles .....	201
6.4. Perspectives .....	203
6.4.1. Modélisation des données toxicocinétiques .....	203
6.4.2. Étude de l'exposition chronique chez l'humain .....	204
6.4.3. Études des mélanges .....	204
6.5. Conclusion .....	206

## **Références** .....

209

## **ANNEXE** .....

233

Annexe 1: <sup>1</sup> H NMR-based metabolomic analysis of biomarkers of effects in human urine samples following controlled and occupational exposure to pyrethroid pesticides.....	235
Abstract .....	237
Introduction .....	238
2. Materials and methods .....	240
2.1. Chemicals .....	240
2.2. Subjects.....	240
2.2.1. Volunteers .....	240
2.2.2. Workers .....	240
2.2.3. Ethics.....	241
2.3. Exposure .....	241
2.3.1. Volunteer exposure .....	241
2.3.2. Worker exposure .....	241
2.4. Sample collection .....	241
2.4.1. Collection of urine in volunteers.....	241
2.4.2. Collection of urine for workers .....	242

2.4.3. Questionnaire .....	242
2.5. <sup>1</sup> H NMR spectroscopic method .....	242
2.6. Statistical analysis .....	243
3. Results .....	245
3.1. <sup>1</sup> H NMR spectroscopy analysis of urine of volunteers .....	245
3.2. <sup>1</sup> H NMR spectroscopy analysis of urine in workers samples.....	245
4. Discussion .....	247
Conclusion.....	251
Conflict-of-interest notification.....	252
Acknowledgements .....	252
References .....	253
Captions to figures .....	258

# Liste des tableaux

## Chapitre 1

Tableau 1 : Sommaire des différentes concentrations d'insecticides pyréthrinoïdes utilisés au Québec et des conditions d'utilisation en champs .....	10
Tableau 2. Valeurs de référence pour la perméthrine et cyperméthrine .....	24
Tableau 3. Récapitulatif des métabolites urinaires utilisés en biosurveillance de l'exposition en fonction des composés mères.....	33
Tableau 4. Résumé des concentrations de trois biomarqueurs (3-PBA, <i>cis</i> -DCCA et <i>trans</i> -DCCA) d'études portant sur des données provenant de la population générale.....	38
Tableau 5. Recensement des données de surveillance biologique de l'exposition chez les travailleurs agricoles.....	39

## Chapitre 2

Tableau 1 : Limite de détection de la méthode utilisée pour la mesure de métabolites urinaires et plasmatiques chez des volontaires exposés oralement à 0,1 mg/kg pc de perméthrine ou de cyperméthrine, ainsi que les limites de détection de la méthode finale utilisée chez les travailleurs agricoles.....	56
Tableau 2 : Variabilité de la méthode utilisée pour la mesure de métabolites urinaires et plasmatiques chez des volontaires exposés oralement à 0,1 mg/kg pc de perméthrine ou de cyperméthrine, ainsi que les paramètres de validation de la méthode finale utilisée chez des travailleurs agricoles.....	57

## Chapitre 3

Table 1. Mean time to peak levels, first-order apparent absorption and elimination half-lives and excretion fraction ( $\pm$ SD) derived from individuals times courses of <i>trans</i> -DCCA, <i>cis</i> -DCCA and 3-PBA in plasma and urine of volunteers following ingestion of 0.1 mg kg <sup>-1</sup> bw of permethrin ( <i>trans/cis</i> : 60:40). (n = 6) .....	100
--	-----

Table 2. Toxicokinetic parameters calculated from the plasma concentration-time profiles of <i>trans</i> -DCCA, <i>cis</i> -DCCA and 3-PBA in volunteers following ingestion of 0.1 mg/kg bw of permethrin ( <i>trans/cis</i> : 60:40) (n = 6). .....	101
---	-----

## Chapitre 4

Table 1. Mean time to peak levels, first-order apparent absorption and elimination half-lives and excretion fraction ( $\pm$ SD) derived from individual times courses of <i>trans</i> -DCCA, <i>cis</i> -DCCA and 3-PBA in plasma and urine of volunteers following ingestion of 0.1 mg kg <sup>-1</sup> bw of cypermethrin ( <i>trans/cis</i> : 58:42) (n = 6).....	131
---	-----

Table 2. Toxicokinetic parameters calculated from the plasma concentration-time profiles of <i>trans</i> -DCCA, <i>cis</i> -DCCA and 3-PBA in volunteers following ingestion of 0.1 mg kg <sup>-1</sup> bw of cypermethrin ( <i>trans/cis</i> : 58:42) (n = 6).....	132
---	-----

Table 3. Time courses of <i>cis</i> -DCCA, <i>trans</i> -DCCA and 3-PBA excretion ( $\mu$ mol/mol creat.) in the urine of volunteers following ingestion of 0.1 mg kg <sup>-1</sup> of <i>trans</i> -/ <i>cis</i> -cypermethrin (58:42) compared with kinetic data of Ratelle et al. (2014) following permethrin dosing (60:40) (n=6 per group).....	133
--	-----

## Chapitre 5

Table 1. Variables documented by questionnaire during the cypermethrin exposure study. .	168
--	-----

Table 2. Characteristics of the study subjects .....	169
--	-----

Table 3. Work practices and conditions during the 3-day time course study (days 1 to 3)....	171
---	-----

Table 4. Distribution of 3-PBA and <i>trans</i> -DCCA concentrations ( $\mu$ mol/mol creatinine) during the 3-day follow-up in the 34 workers exposed to cypermethrin. ....	173
---	-----

Table 5. Distribution of 3-PBA and <i>trans</i> -DCCA urinary excretion rates (pmol/h/kg bw) during the 3-day follow-up of the 34 workers profiles exposed to cypermethrin. ....	175
--	-----

Table 6: Predictors of 3-PBA levels in the urine of workers (n=34) using a linear mixed-effects model (MIMX).....	177
---	-----

## Chapitre 6

Tableau 1. Limites de détection des méthodes analytiques rapportées sur les métabolites des pyréthrinoïdes réalisées avec un spectromètre de masse .....	189
--	-----

## Annexe

Table 1. Endogenous metabolite assignments and relative change in urinary concentrations of metabolites in volunteers and workers before and after exposure to pyrethroids.....	259
Table 2. . Comparison of urinary metabolite excretion in workers according to gender, age, body mass index, high glucose level, alcohol consumption during study, smoking and ethnicity.....	261

# Liste des figures

## Chapitre 1

Figure 1. Structures de quatorze pyréthriinoïdes (selon Morgan, 2012) .....	4
Figure 2. Représentation de l'augmentation des ventes de pyréthriinoïdes au Québec pour la période 2004 à 2010 (Chiffres de Gorse et Balg, 2013). .....	6
Figure 3. Calcul par défaut de la dose d'exposition pour un xénobiotique par différentes voies (ASTDR, 2005).....	11
Figure 4. Schéma d'une pompe à sodium et sites d'action des pyréthriinoïdes. ....	15
Figure 5. Structure moléculaire de la perméthrine et de la cyperméthrine .....	21
Figure 6. Métabolisme de la perméthrine et cyperméthrine. ....	27
Figure 7. 3-PBA et DCCA, principaux biomarqueurs urinaires de la perméthrine et cyperméthrine. ....	32
Figure 8. Schéma de la spectrométrie de masse quadripolaire à temps de vol (Q/TOF).....	34
Figure 9. Les étapes conduisant à l'effet sur le métabolome.....	43

## Chapitre 2

Figure 1 : Figure représentant les paramètres optimisés et l'ordre d'optimisation pour la méthode finale utilisée en biosurveillance .....	54
Figure 2 : Schéma de la méthode analytique finale utilisée pour l'analyse des biomarqueurs d'exposition 3-PBA et <i>cis et trans</i> -DCCA.....	55

## Chapitre 3

Figure 1. Mean time courses of trans-DCCA, cis-DCCA and 3-PBA in plasma (A) and urine (B) of volunteers ( $\pm$ SD) following a single oral administration of 0.1 mg/kg bw of permethrin	
--	--

(*trans/cis*: 60:40) (n = 6). Symbols represent mean values and vertical bars are standard deviations. ....102

Figure 2. Mean time courses of *trans*-DCCA, *cis*-DCCA and 3-PBA cumulative excretion (as a molar % of administered dose) in the urine of volunteers ( $\pm$ SD) following a single oral administration of 0.1 mg/kg bw of permethrin (*trans/cis*: 60:40) (n=6). Values for *trans*-DCCA and *cis*-DCCA are expressed as a percentage of administered *trans*-permethrin and *cis*-permethrin, respectively. Symbols represent mean values and vertical bars are standard deviations. ....104

## Chapitre 4

Figure 1. Mean time courses ( $\pm$ SD) of *trans*-DCCA, *cis*-DCCA and 3-PBA in plasma (A) and urine (B) of volunteers following a single oral administration of 0.1 mg kg<sup>-1</sup> bw of cypermethrin (*trans/cis*: 58:42) (n = 6). Symbols represent mean values and vertical bars are standard deviations. Values for *cis*-DCCA were below the LOD after 24 h post-dosing. ....134

Figure 2. Mean time courses ( $\pm$ SD) of *trans*-DCCA, *cis*-DCCA and 3-PBA cumulative excretion (as a molar % of administered dose) in the urine of volunteers following a single oral administration of 0.1 mg kg<sup>-1</sup> bw of cypermethrin (*trans/cis*: 58:42) (n=6). Values for *trans*-DCCA and *cis*-DCCA are expressed as a percentage of administered *trans*-cypermethrin and *cis*-cypermethrin, respectively. Symbols represent mean values and vertical bars are standard deviations. ....136

## Chapitre 5

Figure 1. Time courses of *trans*-DCCA ( $\Delta$ ) and 3-PBA ( $\bullet$ ) in the urine of workers over a 3-day period following an exposure episode to cypermethrin for the classified cluster of high exposure (expressed as pmol/h/kg bw and  $\mu$ mol/mol creatinine). Worker T13 performing weeding: A and B; pesticide applicator T25b: C and D; pesticide applicator T29a: E and F; pesticide applicator T29b: G and H. [red] represents exposure duration. ....180

# Chapitre 6

Aucune figure

## Annexe

Figure 1. A representative <sup>1</sup> H NMR spectrum with identified metabolites in urinary volunteer sample.....	262
Figure 2. OPLS-DA score plots from the analysis of <sup>1</sup> H NMR spectra of urine in the pre- and post- exposure samples of workers (n=26) (A) and corresponding loading plot (B). Yellow triangles represent pre-exposure samples and green pentagons represent post-exposure samples.....	263
Figure 3. Scheme representing the steps (yellow) that may explain differences in concentrations of metabolites in the urine before and after exposure to insecticides and associated endogenous metabolite molecules.....	265



## Abréviations

3-PBA	Acide 3-phénoxybenzoïque
4F3PBA	Acide 4-fluoro-3-phénoxybenzoïque
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARLA	Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire
ATSDR	<i>Agency for toxic substances and disease registry</i> ou Agence pour les substances toxiques et le registre des maladies.
AUC	Aire sous la courbe
AUMC	Aire sous la courbe du premier moment
°C	Degré Celcius
CDC	<i>Center of Disease Control</i>
CDCA	Acide chrysanthémum carboxylique
CRAAQ	Centre de référence en agriculture et agroalimentaire du Québec
CIRC	Centre International de Recherche sur le Cancer
Cl	Clairance
DBCA	Acide cis-(2,2-dibromovinyl)-2,2-diméthylcyclopropane-1-carboxylique
DCCA	Acide 3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-diméthylcyclopropane-1-carboxylique
DJA	Dose journalière acceptable
DL <sub>50</sub>	Dose létale 50, équivalent à la dose causant la mort de 50% des animaux.
DST	Test de dépistage développementale de Denver
ECMS	Enquête canadienne sur les mesures de la santé (ou CHMS en anglais : <i>Canadian Health Measures Survey</i> ).
EPI	Équipement de protection individuelle
FCI	Fondation canadienne pour l'innovation
FSH	Hormone folliculo-stimulante
g	Grammes
GC	Chromatographie en phase gazeuse
h	Heure
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
IBE	Indice biologique d'exposition

IDLH	<i>Immediately Dangerous To Life or Health Concentrations</i> ou concentration présentant un danger immédiat à la vie
INRS	Institut national de recherche scientifique
INSPQ	Institut national de santé publique du Québec
IRIS	<i>Integrated Risk Information System</i> ou Système intégré d'information sur le risque
IRSST	Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail
kg	Kilogramme
L	Litre
LH	Hormone lutéinisante
LMR	Limite maximale de résidus dans les aliments
LOD	Limite de détection analytique
LOAEL	<i>Lowest-Observed Adverse Effect Level</i> - niveau le plus faible associé à un effet néfaste observé
M	Molaire (nombre de moles/litre)
mol	Mole, soit environ $6,02214040 \times 10^{23}$ atomes
MAPAQ	Ministère de l'agriculture, pêche et alimentation du Québec
MDDELCC	Ministère du développement durable, de l'environnement et de la lutte contre les changements climatiques
MDDEP	Ministère du développement durable, de l'environnement et des parcs (nouvellement MDDELCC)
mg	Milligramme
MG	Moyenne géométrique (ou GM en anglais)
ml	Millilitre
mmol	Millimole
MS	Spectrométrie de masse
n	Nombre (effectif)
ng	Nanogramme
nm	Nanomole
MRT	<i>Mean residence time</i> ou temps de séjour moyen dans l'organisme
NHANES	<i>National Health And Nutrition Examination Survey</i> ou Sondage national sur la santé et examen nutritionnel.
NIOSH	<i>National Institute for Occupational Safety and Health, US</i>

NK	<i>Natural Killer</i> (cellules du système immunitaire)
NMR	Résonance magnétique nucléaire
NOAEL	<i>No-Observed Adverse Effect Level</i> - niveau le plus élevé sans effet néfaste observé
OMS	Organisation mondiale de la santé
OSHA	<i>Occupational Safety and Health Administration</i> , US
pc	Poids corporel (en Anglais: <i>body weight</i> (bw))
PEL	<i>Permissible Exposure Limit</i> ou limite d'exposition permmissible
pmol	Picomole ( $10^{-12}$ moles)
Q/ToF	Spectromètre de masse à temp de vol quadripolaire ( <i>Quadripole Time of Flight</i> )
REL	<i>Recommended Exposure Limit</i> ou limite d'exposition recommandée
RfD	Dose de référence par ingestion
rpm	Rotations par minute
SDQ	Questionnaire sur les forces et difficulté (évaluation développementale)
STEL	<i>Short-Term Exposure Limit</i> ou limite d'exposition à court terme.
$t_{1/2}$	Demi-vie : temps nécessaire pour éliminer 50% de la substance
NTF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> (réponse du système immunitaire)
TWA	<i>Time-Weighted Average concentration for a workshift</i> ou concentration moyenne pour un quart de travail
$\mu\text{g}$	Microgramme ( $10^{-6}\text{g}$ )
$\mu\text{l}$	Microlitre ( $10^{-6}\text{L}$ )
$\mu\text{mol}$	Micromole ( $10^{-6}$ moles)
US. EPA	<i>U.S. Environmental Protection Agency</i> ou L'Agence américaine de protection de l'environnement
Vd	Volume de distribution
VLE	Valeur limite d'exposition
VME	Valeur moyenne d'exposition
Tmax	Temps pour atteindre la concentration maximale
VPC	Vêtements de protection cutanée



# Remerciements

Je tiens à remercier certaines personnes qui ont eu un impact dans la poursuite de ce projet ou dans la facilitation de ses étapes.

## Université de Montréal :

Je tiens à remercier ma directrice Michèle Bouchard pour sa patience à me transmettre sa rigueur professionnelle et ses connaissances scientifiques. Michèle, je souligne la qualité de tes compétences qui font de toi une chercheuse de renommée internationale et pour lesquelles tu as toute mon éternelle estime. Je te suis reconnaissante de m'avoir offert la chance de faire partie de ton équipe. Mon succès actuel te revient.

Je remercie également mes amis et collègues qui m'ont écouté et ont suggéré plus d'une fois des solutions à mes problèmes techniques mais également personnels! Merci donc à Dr. Marjory Moreau et Dr. Igor Pujalté, pour leur soutien et leur amitié. Vous conserverez mon affection même si cette étape est terminée!

Merci à mes collègues étudiants et chercheurs qui ont fait la majeure partie du chemin avec moi et qui ont partagé travail et congrès. Une ambiance de travail agréable lors d'une thèse est toujours souhaitable à sa réussite (ordre alphabétique) : Cyril Catto, Jonathan Côté, Denis Dieme, Roberto Heredia, Axelle Marchand, Alexandra Noël.

Merci aux techniciens qui m'ont aidé à faire mes analyses chez les travailleurs, car près de 1000 échantillons, ça demande beaucoup de temps. Merci Marc Mantha et Ross Thuot pour vos efforts et votre bon travail.

Je tiens aussi à préciser que je suis fière d'être rattachée à l'Université de Montréal et à l'Institut de recherche en santé publique de l'UdeM (IRSPUM) pour la qualité de l'enseignement et la renommée, qui m'ont entre autres permis de faire un séjour de recherche à l'Université Nationale de Taiwan, d'obtenir un contrat pour l'Agence de santé publique du Canada et d'assister à de nombreux congrès à l'international tout au long de mon doctorat.

J'en profite d'ailleurs pour remercier Pr Ching Yu Lin pour sa gentillesse et son accueil lors de mon séjour dans son équipe à Taipei.

Famille :

J'aurais mille raisons de remercier ma famille, mais je me contenterai de mettre l'emphase sur leur apport à la réussite de mon projet doctoral. Merci à mon père Alain et ma sœur Lyly-Anne qui m'ont fait le plaisir de toujours démontrer de l'intérêt lorsque je parlais de mon projet. Et maman... merci de ne jamais être loin.

Merci à mon meilleur ami Francis Paquette pour avoir échangé avec moi sur les études graduées en général et m'avoir ouvert les portes de son monde humanitaire qui a influencé ma propre vision de la santé publique.

En terminant, je dois surtout remercier mon amoureux, Jérôme Payette, qui m'a supportée durant toutes mes études doctorales. Jérôme, tu sais bien que sans toi je n'aurais pas terminé ce projet. La réalisation de cette étape de ma vie, je te la dois.

Et merci à Abu. Car même si tout change, Abu il reste le même.

# Préface

Car une thèse est un projet d'envergure, et que l'étudiant est un auteur qui relate ses découvertes ayant eu un impact sur son parcours académique, professionnel mais aussi personnel, une telle entreprise de rédaction se doit de porter un message plus grand que le projet en tant que tel.

C'est pour poursuivre ma formation afin de renforcer mon profil en sciences appliquées dans un objectif de carrière d'intervention en santé publique que j'ai commencé une thèse. De plus, l'attrait de la stimulation intellectuelle que le milieu académique offre m'emballait. Lorsque l'on me demandait la raison de ce retour aux études, je justifiais également mon choix en mentionnant que la science est créative et stimule l'imaginaire. Après tout, la science ne se doit pas d'être ennuyante. Après quatre ans de thèse, j'y crois encore! Après des périodes plus difficiles de ce projet, je retourne à mes premières impressions : la recherche stimule les idées. Toutefois, la rigueur les oriente. Je suis cependant en accord que, «l'imagination est plus importante que le savoir» [A.Einstein]. Sur cette recherche «de vérité» qu'est la thèse découlant de la recherche scientifique, je me positionnerai en insistant sur l'applicabilité de la science, essentielle pour son développement et sa crédibilité en elle-même. Le chercheur, voire l'intellectuel, a une responsabilité sociale de transmettre ses découvertes à des fins d'utilisation. En terminant, je peux affirmer que plus j'en sais, moins j'en connais. Toutefois, j'ai conservé la certitude de vouloir contribuer à l'amélioration de la qualité de vie et de relever les défis aussi stimulants de ceux auxquels j'ai fait face durant ces quatre dernières années.





# Avant-propos

## La place de la santé environnementale et la santé au travail au sein de la santé publique

Les organismes œuvrant en santé publique au Québec orientent leurs activités sous quatre thèmes principaux : la prévention des blessures et maladies, la promotion d'habitudes de vie saines, la protection de la santé et la surveillance de l'état de santé de la population. Ces orientations sont d'ailleurs retrouvées dans l'article 9 de la Loi sur la Santé Publique au Québec (Gouvernement du Québec, 2014a). Ces champs d'action couvrent plusieurs domaines de compétences, dont la toxicologie, l'épidémiologie, les biostatistiques, tels que retrouvées parmi les sept thèmes d'expertise de l'Institut national de santé publique du Québec (INSPQ, 2014).

La santé environnementale est un terme utilisé depuis les années 90 et étudie les interactions entre le milieu ambiant et la santé. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) estime que près du quart de la charge mondiale de morbidité et des décès peuvent être attribués à des facteurs environnementaux, il est donc essentiel de prendre en compte cet aspect de la santé publique (OMS, 2014b). L'OMS a proposé en 1994 une définition de la santé environnementale qui englobe la santé au travail.

## Le risque spécifique des travailleurs agricoles

L'analyse de risque toxicologique est une approche utilisée en santé au travail et santé environnementale. Elle est un processus par lesquels les scientifiques évaluent la probabilité d'effets néfastes associée à l'exposition à des contaminants, en caractérisant la relation entre deux aspects toxicologiques, soient l'exposition au composé étudié et la relation dose-réponse.

Parmi les sous-populations des plus vulnérables aux risques reliés aux contaminants, on compte les travailleurs agricoles qui ont un contact potentiellement plus important avec certains contaminants comme les pesticides dans le contexte de leur travail que l'ensemble de la population. En effet, l'agriculture est un domaine où l'utilisation d'herbicides, d'engrais et

d'insecticides est omniprésente. Les travailleurs sont en contact avec ces substances, qui font souvent partie intégrante de leur travail. Les travailleurs migrants résidant temporairement près d'exploitations agricoles constituent un des sous-groupes les plus à risque. La reconnaissance de la vulnérabilité de cette sous-population et l'importance de diminuer les inéquités environnementales ont déjà été reconnues (Arcury et Quandt, 2003). En effet, en plus des travailleurs agricoles largement en contact avec les pesticides, leurs familles sont également à risque d'être davantage exposées (Bouvier *et al.*, 2005). Une association a notamment été montrée entre l'exposition à certains insecticides et le faible revenu des familles de travailleurs agricoles (Trunnelle *et al.*, 2014). Cette mention d'inéquité environnementale se réfère au concept de justice environnementale qui exige le même degré de protection contre les risques environnementaux et l'égalité d'accès au processus de prise de décision afin d'avoir un environnement sain où vivre, apprendre et travailler pour tous (US. EPA, 2014b).

En résumé, l'analyse de risque toxicologique est donc un outil utilisé en santé publique. En fait, cette expertise est nécessaire pour la gestion du risque par les décideurs qui devront élaborer des politiques pour assurer la protection de la santé de la population. L'exposition est l'un des deux aspects à estimer pour caractériser le risque. L'exposition à plusieurs contaminants environnementaux, dont les pesticides, présente des risques pour la santé et requiert une analyse rigoureuse afin d'encadrer leur utilisation (OMS, 2014a). Les travailleurs agricoles étant une population susceptible d'être davantage exposée, des efforts pour surveiller leur risque sont souhaitables afin de prévenir les effets sur la santé et donc améliorer la santé de ce groupe de la population.





# Chapitre 1

## INTRODUCTION

---



# 1. ÉTATS DES CONNAISSANCES

## 1.1. Les pesticides pyréthrinoïdes comme contaminants prioritaires

Les pesticides pyréthrinoïdes sont des insecticides largement utilisés. D'ailleurs, ils font régulièrement une apparition dans l'actualité, la dernière en date du 23 juin 2014 sur les ondes de Radio-Canada (Radio-Canada, 2014) et faisant référence à l'étude associant l'exposition aux pyréthrinoïdes et les risques d'autisme (Shelton *et al.*, 2014).

### 1.1.1. Historique de leur utilisation

Les pyréthrines sont des composés issus de fleurs de Chrysanthèmes. Ils furent utilisés dans l'antiquité comme pesticide puis redécouvertes au début du 20<sup>e</sup> siècle (Housset et Dickmann, 2009). Le problème qui restreignait leur popularité reposait sur le fait qu'ils étaient dégradés rapidement suite à l'exposition solaire. Leur activité diminuait donc en conséquence. Durant la Deuxième Guerre mondiale, les recherches sur les structures de ces molécules ont permis de synthétiser des composés analogues. Les pyréthrinoïdes furent parmi les premières molécules synthétiques analogues aux pyréthrines naturelles, mais dont la structure chimique a été modifiée afin d'augmenter leur activité (Housset et Dickmann, 2009). En 1972, trois composés furent produits, plus résistants à la dégradation solaire (avec une durée de vie sur le sol avant sa dégradation passant de quelques heures à quelques jours afin de prolonger son activité insecticide). Ces nouveaux produits prometteurs étaient la perméthrine, la cyperméthrine et la deltaméthrine. Elles révolutionnèrent le domaine des pesticides de par leur efficacité, leur faible toxicité chez l'humain comparativement aux insecticides organosphosphatés, ainsi que leur vitesse d'action insecticide de quelques minutes (Housset et Dickmann, 2009). Dans les années 1990, le retrait des organophosphorés dû à leur toxicité a conduit à une augmentation de l'utilisation des pyréthrinoïdes. Aujourd'hui, ces derniers représentent près de 25% de tous les insecticides vendus (Housset et Dickmann, 2009). Cette classe de pesticides comprend actuellement plus d'une dizaine de composés actifs (figure 1).

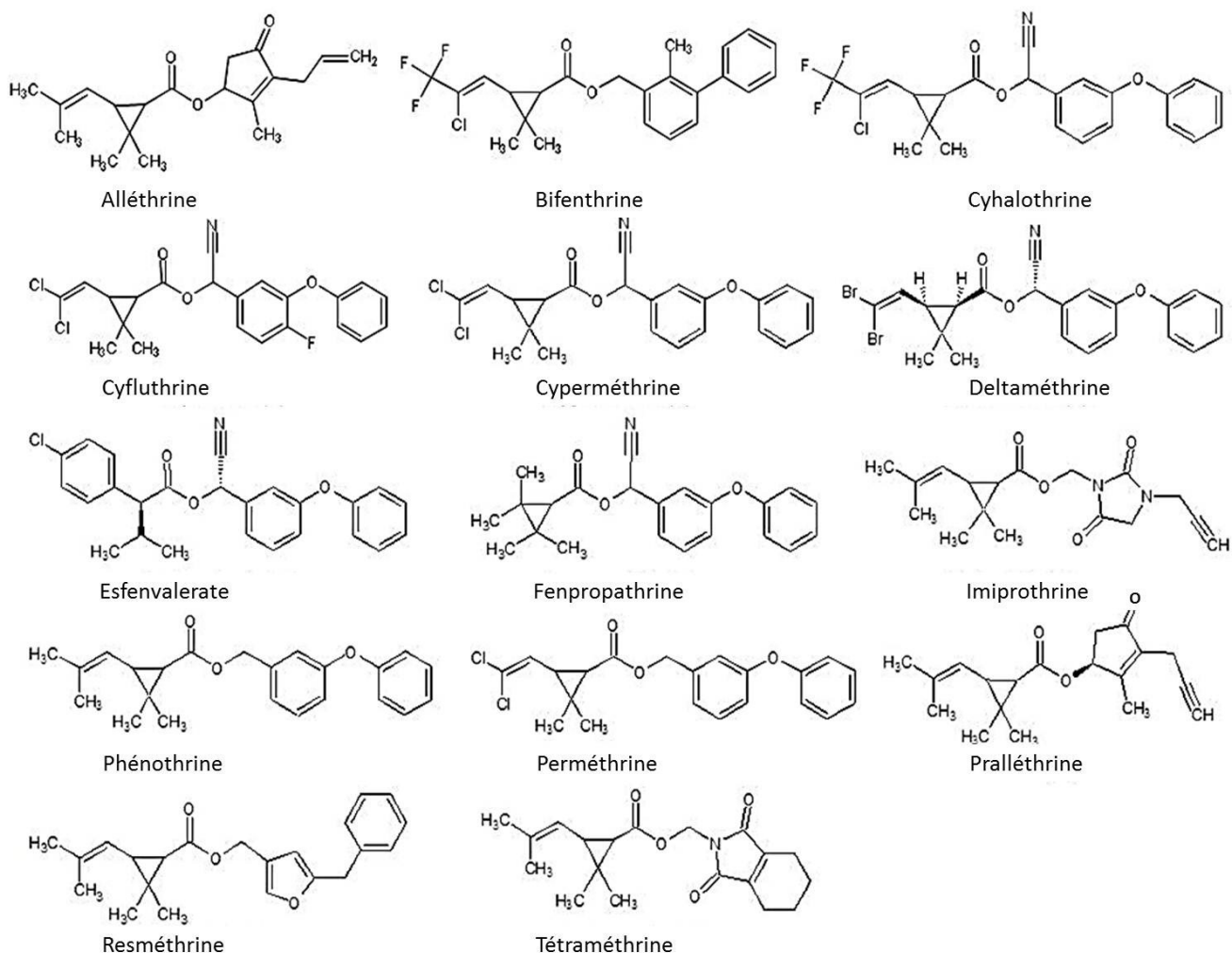


Figure 1. Structures de quatorze pyrétroïdes (selon Morgan, 2012)

### 1.1.2. Caractéristiques structurales et physico-chimiques

Les pyrétroïdes sont des composés synthétiques organiques ayant un degré élevé de solubilité dans les lipides (lipophilie). Ces molécules sont classées comme étant de type I ou de type II, selon le substituant de la moitié alcool ou acide de la molécule similaire à la pyréthrine. Cette substitution va également influencer l'effet toxique. Le groupe I est défini de



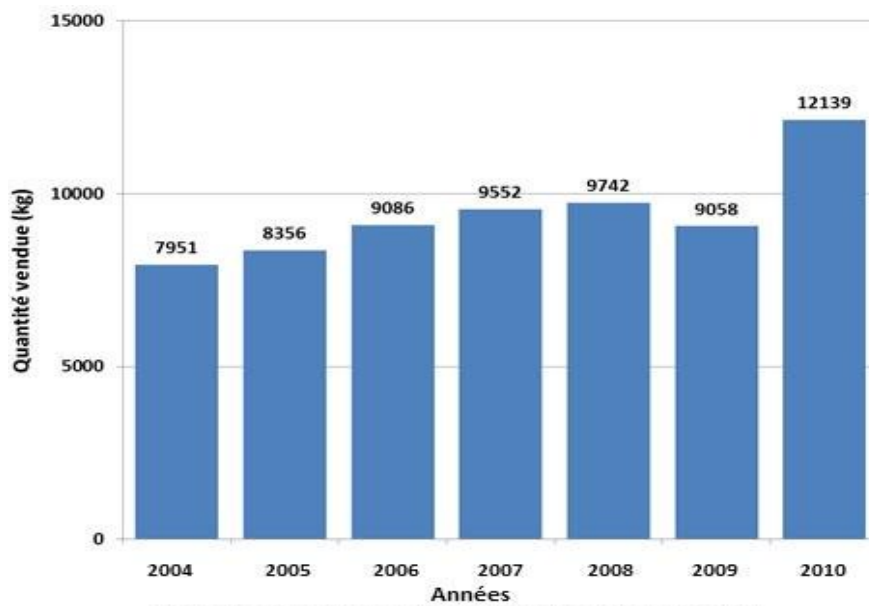
manière assez large et comprend l'alléthrine, la perméthrine et la resméthrine (Matsuo et Mori, 2012; Soderlund *et al.*, 2002), contenant un groupement qui peut être soit un phénoxybenzyl, soit un alcool halogéné. Les pyréthriinoïdes de type II sont plus étroitement définis en fonction de leur structure chimique et contiennent en particulier un groupement alcool  $\alpha$ -cyano 3-phénoxybenzyl. Aussi, certains pyréthriinoïdes de type II possèdent une modification de la portion acide de la molécule afin d'inclure un cycle phényle (Bloomquist, 2013). La bifenthrine, la cyfluthrine, la cyhalothrine, la cyperméthrine, la fenpropathrine, le fenvalerate et la téfruthrine ont été classés sous le groupe des pyréthriinoïdes de type II (Matsuo et Mori, 2012; Soderlund *et al.*, 2002).

Les pyréthriinoïdes sont des molécules qui se retrouvent, à température ambiante et sous forme pure, souvent en substances cireuses, mais pouvant être aussi sous diverses formes allant du liquide au solide. Les valeurs de solubilité dans l'eau sont très faibles rendant plusieurs pyréthriinoïdes insolubles dans un milieu aqueux. Les pressions vapeurs, indicateur de leur volatilité, sont également très faibles. La solubilité dans un solvant organique est toutefois excellente. Les composés commerciaux ne contiennent qu'un certain pourcentage d'ingrédient actif, se situant généralement entre 5 et 35%. Les applications se réalisent par aérosols; une diffusion dans l'air est possible mais restreinte due à leur faible volatilité après sédimentation. Ces substances sont peu mobiles et ont tendance à se lier au sol et aux sédiments organiques. Ces pesticides se retrouvent donc dans les milieux aquatiques sous forme complexée aux particules (Matsuo et Mori, 2012). Les molécules sont dégradées rapidement par photolyse et oxydation. Leur demi-vie dans l'environnement se situe entre 2 et 97 jours (ATSDR, 2003; Université de Hertfordshire, 2013). Par exemple, la deltaméthrine a une demi-vie de dégradation de 11 à 72 jours dans le sol selon l'humidité, la température, l'ensoleillement et l'activité bactérienne (Elliott 1989; OMS 1990).

### **1.1.3. Ampleur de leur utilisation dans la population générale**

Les pyréthriinoïdes sont largement utilisés comme pesticides en agriculture comme en horticulture, mais également en médecine vétérinaire et en tant qu'insecticides domestiques (INSPQ, 2005). Leur importance semble augmenter chaque année. L'utilisation des

pyréthrinoïdes a subi une croissance de 45% entre 2005 et 2010 au Québec (figure 2) et se classaient en 2011 en 27<sup>e</sup> position des pesticides les plus vendus au Québec, toutes utilisations et types de pesticides confondus, soit 3,5% des pesticides vendus (Gorse et Balg, 2013). Sur le total des ventes canadiennes d'insecticides, les pyréthrinoïdes se situent au 41<sup>e</sup> rang (Santé Canada, 2011). De ces pyréthrinoïdes, la perméthrine arrive au 1<sup>er</sup> rang, suivi de la lambda-cyhalothrine et de la cyperméthrine. Actuellement, c'est la classe d'insecticide la plus utilisée mondialement (Housset et Dickmann, 2009). La population y est principalement exposée par l'alimentation. L'ingestion de fruits et légumes ou de céréales, mais également par contact cutané lors de l'utilisation d'anti-moustique et d'insecticide de jardin, constituent les principales voies d'exposition. Au Québec, il a été observé que ce sont surtout les fruits et légumes importés qui présentent les taux les plus élevés de pesticides pyréthrinoïdes (INSPQ, 2012). Parmi les 13 pesticides les plus fréquemment détectés dans les fruits et légumes retrouvés sur le marché canadien de 2002-2005, la perméthrine se retrouve en 12<sup>e</sup> position sur les aliments canadiens, tandis qu'elle se retrouve en 4<sup>e</sup> position des aliments importés (INSPQ, 2012). Sur 57 pesticides, un indicateur de risque élevé a été attribué aux pyréthrinoïdes, les classant 15<sup>e</sup> basé sur le risque sur la santé et 6<sup>e</sup> basé sur le risque pour l'environnement (Gorse et Balg, 2013).



**Figure 2. Représentation de l'augmentation des ventes de pyréthrinoïdes au Québec pour la période 2004 à 2010 (Chiffres de Gorse et Balg, 2013).**

L'exposition continue par l'alimentation équivaut à une exposition orale chronique (US. EPA, 1998). Ayant une action insecticide, les pyréthrinoïdes sont aussi utilisés dans des formulations à usage domestique (ex. Sawyer inc.) ainsi que dans le traitement du bois (Lorenz *et al.*, 1985). Plus de 75% des américains sont suspectés avoir une exposition à ce type de pesticides, que ce soit dans leur alimentation, pour un usage domestique ou dans leur milieu de travail (Barr *et al.*, 2010). L'Enquête canadienne sur les mesures de la santé (ECMS) a permis de relever la présence de résidus de pesticides dans 99% des échantillons biologiques testés (Santé Canada, 2013). D'ailleurs, les limites de détection (LOD) analytiques diffèrent d'un facteur 10 entre le projet de biosurveillance du *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) 2001–2002 (Barr *et al.*, 2010) et celui de l'Enquête canadienne sur les mesures de la santé (ECMS-CHMS) -cycle 2010-2012 (Santé Canada, 2013). Alors que le pourcentage de détection analytique était de 75,4% dans le NHANES (LOD pour l'acide 3-phénoxybenzoïque (3-PBA): 0,1 µg/L), 99,5% des échantillons présentaient des valeurs au dessus de la LOD dans l'ECMS (LOD : 0,01 µg/L).

Il semble toutefois y avoir une différence d'exposition entre les milieux, rural ou urbain, et selon les saisons. Une étude en milieu agricole dans la région de la Montérégie, ciblant plusieurs biomarqueurs des pyréthrinoïdes, a montré une plus grande exposition en milieu rural lors de la période estivale (Couture *et al.*, 2009). D'autres études viennent confirmer une variation saisonnière d'exposition avec des valeurs plus l'élévée en été qu'en hiver (Wang *et al.*, 2007; Whitmore *et al.*, 1994). Le changement de comportement alimentaire, soit la plus grande consommation de fruits et légumes l'été, pourrait justifier également cette variation saisonnière (Ziegler *et al.*, 1987). Il faut ajouter qu'en raison de son insolubilité dans l'eau, le lavage des fruits et légumes ne réduit que partiellement l'exposition via l'ingestion de produits frais (Chauhan *et al.*, 2014). De plus, comme les pyréthrinoïdes sont des ingrédients actifs de plusieurs formulations d'insecticides domestiques, il est fort probable que ce facteur contribue à l'augmentation de l'exposition en saison estivale.

En somme, la contribution des différentes sources et les différentes voies de l'exposition aux insecticides dans la population générale est difficile à estimer, entre autres étant donné les nombreux facteurs dont la détermination de la contamination alimentaire, l'utilisation de

produits parasites sur les animaux domestiques, le fait de résider près d'un jardin ou d'utiliser des insecticides à la maison (Bouvier *et al.*, 2005). D'ailleurs, la population de la ville de New York est plus exposée que l'ensemble des États-Unis, ce qui démontre que l'exposition en région urbaine est également considérable (McKelvey *et al.*, 2013).

Il y a également une inquiétude grandissante concernant l'utilisation des pesticides pyréthrinoïdes en santé mondiale. C'est un problème d'envergure dans les pays en voie de développement où l'encadrement législatif est moindre. Ce pesticide étant efficace et peu coûteux, il est universellement employé comme insecticide pour la lutte contre la malaria (Alonso et Tanner, 2013). L'exposition à ces molécules est considérable pour la population générale, ici comme ailleurs.

#### **1.1.4. Milieu agricole et l'utilisation croissante de pyréthrinoïdes**

Même si la population générale est exposée, le risque accru d'effets sur la santé associé aux pyréthrinoïdes concerne davantage les travailleurs. Au Québec, alors qu'il y a près de 60 000 travailleurs en agriculture et 40 000 travailleurs en horticulture (MAPAQ, 2010), il est aisé d'imaginer l'ampleur du nombre d'individus possiblement exposés lors d'activités professionnelles. Les travailleurs dans le domaine spécifique de l'agriculture sont les plus susceptibles d'être exposés. En effet, que ce soit lors de la préparation de la formule, de l'application du pesticide, ou du contact direct avec le fruit ou légume lors de la récolte, les travailleurs sont directement exposés par voie cutanée et inhalation. De tous les pesticides vendus au Québec pour l'élevage et les travaux agricoles, les pyréthrinoïdes se retrouvent au 2<sup>e</sup> rang après les dithiophosphates, avec une portion de 20,1% du marché (MDDEP, 2012). Lafortune et Panisset (1988) ont observé que seulement 42 à 60 % des travailleurs agricoles manipulaient les pesticides de façon jugée sécuritaire et que 60 % des participants avaient déjà ressenti des malaises associés à la manipulation de pesticides.

Au Québec, la Loi sur les pesticides (chapitre P-9.3), ainsi que le Code de gestion des pesticides visent une utilisation sécuritaire de ces substances. Ces cadres réglementaires visent à assurer entre autres les compétences des utilisateurs et des vendeurs en ce qui concerne les

dangers reliés à ces produits et encadrent l'utilisation professionnelle sécuritaire pour les travailleurs en contact avec ces pesticides. Elle règlemente notamment le délai de réentrée dans les champs après application et axe les recommandations sur les actions de prévention et les mesures d'hygiène adéquates (Gouvernement du Québec, 2014b; 2014c). L'exposition principale des travailleurs se produit lors de l'épandage qui est réalisé à l'aide de vaporisateurs d'aérosols. L'inhalation et le contact cutané sont les voies principales d'exposition pour cette sous-population (Vermeulen *et al.*, 2002). La voie orale est plus secondaire et possible seulement s'il y a une ingestion accidentelle. Les expositions peuvent être diverses et il existe actuellement peu de données sur les caractéristiques de ces expositions. De plus, l'exposition est variable, due au contact saisonnier des travailleurs (Wang *et al.*, 2007). La variation durant la même saison semble être associée aux différentes tâches agricoles (plantation désherbage, récolte) et selon le calendrier de ces cycles pour les différents végétaux (Arcury *et al.*, 2009).

Les pesticides pyréthrinoïdes sont vendus au Québec sous les noms commerciaux de : Ambush, Decis, Deltagard, Dragnet, Perm-Up, Pounce, Prelude, Ripcord, Up-Cyde (MDDEP, 2014; SAGE, 2014a). Ils sont utilisés fréquemment sur des cultures de laitue, céleri et brocoli (INSPQ, 2012), mais peuvent être retrouvés sur une foule d'autres cultures dont le maïs et les fraises. Les délais de réentrée après application de pyréthrinoïdes sont courts et varient de 12 à 24 h tandis que les délais de récolte après application varient de 2 à 21 jours (tableau 1). Le tableau 1 résume les ingrédients actifs des différentes formulations les plus courantes au Québec et leur spécification d'application.

**En somme, l'utilisation des pesticides pyréthrinoïdes augmente à chaque année au Québec. La population générale est exposée quotidiennement par l'alimentation. Toutefois, les travailleurs en agriculture utilisant ces insecticides pourraient être davantage exposés. Leur utilisation est déjà encadrée, mais comme l'exposition est souvent complexe, plusieurs paramètres doivent être considérés pour bien évaluer le risque relié à ces pesticides.**

**Tableau 1 : Sommaire des différentes concentrations d'insecticides pyréthrinoïdes utilisés au Québec et des conditions d'utilisation en champs**

Ingrédient actif	Nom commercial	Concentration commerciale	Description des conditions d'utilisation (Sage Pesticide.qc.ca)	Dose d'application avant dilution*
Cyperméthrine	Ripcord 400	407 g/L	Vaste gamme de cultures	60-250 ml/ha
	Up-Cyde 2.5 Ec	250 g/L	Vaste gamme de cultures	1075-2150 ml/ha
Perméthrine	Ambush 500 Ec/ Ambush 50 Ec	500 g/L	Cultures maraîchères, fruitières et sur les arbres et arbustes ornementaux	140-425 ml/ha
	Bio- Environmental Permethrin	0,5%	Cultures fruitières, légumières et dans les cultures ornementales en serre et en champ	ND
	Pounce 384 Ec/ Perm-Up/ Dragnet	384 g/L	Cultures de fruits, de légumes, en grandes cultures et sur les arbres et arbustes ornementaux	45-520 ml/ha
Téfluthrine	Force 3.0g	3%	Maïs grain, le maïs fourrager et le maïs sucré	10-25 kg/ha
Lambda-cyhalothrine	Demand Cs/ Lambda-Cyhalothrin Cs	100 g/L	Fourmis dans les gazons	370 ml/ha
	Endigo	106 g/L	Puceron du soya et la chrysomèle du haricot dans le soya et les haricots secs	220-410 ml/ha
	Matador 120 Ec	120 g/L	Grandes cultures, cultures maraîchères et fruitières	58-188 ml/ha
	Scimitar Cs	100 g/L	Fourmis dans les gazons	62-150 ml/ha
	Silencer 120 Ec	120 g/L	Grandes cultures, cultures maraîchères et fruitières.	42-125 ml/ha
	Voliam Xpress	50 g/L	Pyrale du maïs, le ver de l'épi du maïs et le ver gris occidental du haricot dans le maïs	500 ml/ha
	Warrior	122 g/L	Cultures légumières, fruitières et dans les grandes cultures	75-125 ml/ha
Deltaméthrine	Concept	10 g/L	Pomme de terre, la tomate, les crucifères, le bleuets et le soya.	325-650 ml/ha
	Decis 5 Ce Decis Fl	50 g/L	Insectes et acariens dans plusieurs grandes cultures, cultures céréalières, légumières et fruitières	100-300 ml/ha
	Deltagard Sc	50 g/L	Gazon et certaines plantes ornementales en serre	1200 ml/ha

Note : Données provenant de la fiche commerciale ou du site [agrireseau.qc.ca](http://agrireseau.qc.ca)

## 1.2. Les voies d'exposition aux pyréthrinoïdes et l'estimation de l'exposition potentielle

Idéalement, pour estimer la dose d'exposition totale reçue par un individu dans une journée, la méthode par défaut consiste à additionner la contribution de toutes les voies d'exposition possibles (figure 3). Plusieurs paramètres sont à considérer pour chaque voie d'exposition, d'autant plus que chaque type d'exposition et chaque contaminant est associé à un coefficient d'absorption différent. L'exposition multiple en milieu professionnel est donc très complexe à estimer.

**Qu'est-ce la dose?**

DOSE potentielle= [Dose ingérée potentielle] + [Dose cutanée potentielle] + [Dose inhalée potentielle]

$$\text{DOSE} = \frac{[C_{\text{aliment/eau}} \times VI \times F] + [C \times SC \times T] + [C_{\text{air}} \times DR \times F \times T]}{\text{Poids corporel}}$$

Où :

- C : Concentration
- SC: Surface corporelle
- T : Temps d'exposition
- DR: Débit respiratoire
- F : Fréquence
- VI: Volume ingéré

\*La dose absorbée dépendra des coefficients d'absorption pour chaque voie selon la molécule donnée

Figure 3. Calcul par défaut de la dose d'exposition pour un xénobiotique par différentes voies (ASTDR, 2005)

### 1.2.1. L'exposition orale

Comme il a été mentionné précédemment, une voie d'exposition importante pour la population générale est l'ingestion d'aliments contaminés par des résidus de pesticides. La dose potentielle d'exposition dépendra alors de la concentration dans l'aliment, du volume ingéré et de la fréquence d'ingestion. Lorsque l'on parle de l'exposition orale, autre qu'une

exposition aiguë accidentelle, il est incontournable d'aborder le concept de limites maximales de résidus (LMR). Ces concentrations représentent les niveaux maximaux observés dans les aliments et jugées sécuritaires pour l'humain selon les données disponibles actuellement. Au Canada, ces concentrations sont établies par Santé Canada (2012). Leur évaluation tient compte de l'exposition globale aux produits insecticides, des effets cumulatifs des produits et de la variation de la sensibilité de certains sous-groupes de la population, dont les enfants et les femmes enceintes. Les valeurs de ces LMR sont dans l'ordre de 1 ppm pour plusieurs des pyréthrinoïdes.

### **1.2.2. L'exposition cutanée**

L'exposition cutanée est difficile à établir étant donné sa complexité. Selon Vermeulen *et al.* (2002), il y a quatre variables qu'il est essentiel de connaître pour estimer l'exposition cutanée : la concentration du contaminant dans le milieu, la surface exposée et la durée et fréquence de l'exposition. Pour établir la dose, il faut évidemment considérer les propriétés physico-chimiques de la substance, qui renseignent sur sa capacité à traverser les barrières cutanées. Une étude de Fenske (1990) estime qu'entre 4 et 22% de la surface corporelle est exposée aux pesticides chez les travailleurs agricoles. Cette estimation varie en fonction du type d'activités ou du port de vêtements de protection. Même si la majorité des études conclut en une protection accrue par le port d'équipement de protection individuelle (Bradman *et al.*, 2008; Fenske, 1988; Garrod *et al.*, 2000), ces études mentionnent que le port d'équipement de protection ayant un matériel adéquat et le comportement responsable des utilisateurs sont des facteurs nécessaires à la réduction de l'exposition aux pesticides. Aussi, l'exposition augmente considérablement si l'utilisation se déroule dans un bâtiment intérieur fermé (Bradberry *et al.*, 2005), par exemple lors de la préparation de l'insecticide ou lors d'utilisation en serres.

### **1.2.3. L'exposition par inhalation**

L'exposition par l'inhalation dépend de la concentration dans l'air, du débit respiratoire et du temps et fréquence de l'exposition. Actuellement, il n'y a aucune étude qui estime l'apport de la voie inhalée à l'exposition totale aux pyréthrinoïdes. Leng *et al.* (1997a) ont étudié



l'élimination d'un pyréthriinoïde, la cyfluthrine, chez l'humain, mais la fraction absorbée de cette molécule suite à l'exposition n'a pas été rapportée probablement dû aux paramètres d'exposition complexes.

Le contexte d'exposition est spécifique chez les travailleurs en agriculture. Même si l'apport par l'alimentation n'est pas à négliger, les principales voies d'exposition professionnelle pourraient être le contact cutané et la voie respiratoire. Le port du masque de protection étant requis lors de l'épandage en sol québécois, la voie d'exposition majeure semble se produire par contact cutané. Les gouttelettes d'aérosol sont arrêtées par le masque respiratoire et le courant d'air extérieur disperse le contaminant. Une étude a estimé l'apport des voies d'exposition chez les travailleurs à 10% par inhalation en présence de masques respiratoires et 90% par voie cutanée (Vermeulen *et al.*, 2002).

**L'estimation indirecte de l'exposition à partir des concentrations externes et des taux de contact est donc incertaine. L'exposition aux pyréthriinoïdes est complexe et difficile à établir et dépend également des différents types de tâches agricoles. Les diverses voies d'exposition peuvent conduire à des niveaux absorbés différents et potentiellement à des différences au niveau des manifestations des effets. Il est essentiel de cerner adéquatement l'exposition réelle et donc les doses absorbées pour bien évaluer le risque. La biosurveillance s'avère essentielle pour la prise en compte de l'exposition multi-voies complexe.**

### 1.3. La toxicité générale des pyréthriinoïdes

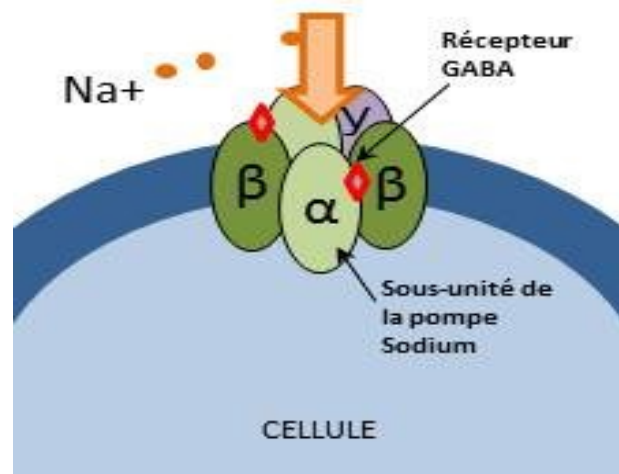
L'effet insecticide des pyréthriinoïdes est associé à l'effet neurotoxique. L'organe cible est l'ensemble du système nerveux. Les pyréthriinoïdes sont considérés comme étant beaucoup plus toxiques chez l'insecte que chez l'humain. Cette différence serait 2250 fois plus importante chez l'insecte, étant donné les différences inter-espèces dans la sensibilité des canaux sodium, de la différence de masse et de la différence de température corporelle (Bradberry *et al.*, 2005). Les types d'effets indésirables chez l'humain sont principalement des effets immunitaires et endocriniens (Dilek et Muranli, 2013; Emara et Draz, 2007; Zhao *et al.*, 2010). Puisque les effets toxiques varient en fonction de la voie et de la dose d'exposition, les facteurs seront associés à des symptômes cliniques différents (Clark, 1995).

Plusieurs études ont montré les effets d'une exposition aiguë accidentelle chez l'humain (Chen *et al.*, 1991; Gotoh *et al.*, 1998). Chen *et al.* (1991) ont réalisé une étude épidémiologique transversale chez des travailleurs agricoles dans des fermes de coton. Ils ont rapporté des symptômes en milieu professionnel suite à une exposition tels que la perte de sensation faciale, la nausée, des vertiges, de la fatigue et la perte d'appétit. L'exposition aiguë à des doses plus élevées absorbées par ingestion peut entraîner des vomissements et diarrhées, une perte de conscience et une acidose métabolique ainsi qu'une sensation de brûlure dans la bouche (Gotoh *et al.*, 1998). Une somnolence, de la fatigue, des palpitations et un trouble de la vision sont également possibles (Bradberry *et al.*, 2005). Dans une étude de cas, des symptômes d'hyperactivité, des tremblements, des convulsions et une éventuelle paralysie ont aussi été rapportés suite à une intoxication orale aiguë (Gotoh *et al.*, 1998).

Cependant, il est difficile éthiquement de tester la toxicité aiguë sur des êtres humains, le modèle animal prévaut donc actuellement. Néanmoins, les données reliées à la toxicité chronique proviennent autant d'expérimentations animales que d'études épidémiologiques chez l'humain. Il y a moins d'études portant sur les effets chroniques des pyréthriinoïdes à faibles doses.

### 1.3.1. Neurotoxicité et effets neurologiques

Tel que mentionné précédemment, les pyréthriinoïdes peuvent induire des effets neurotoxiques, ce qui provoque d'ailleurs l'effet insecticide recherché (Bradberry *et al.*, 2005). Les pyréthriinoïdes ont un effet sur le système nerveux central et périphérique, en raison d'une ouverture prolongée des canaux sodiques (Kühn *et al.*, 1999). Le mode d'action est bien détaillé dans plusieurs études biochimiques. Les pyréthriinoïdes augmentent la perméabilité de la membrane cellulaire aux ions sodium, ce qui prolonge l'influx nerveux et augmentent le temps de repolarisation des cellules (Bloomquist, 1993; Gotoh *et al.*, 1998; Soderlund et Knipple, 1995). Il a aussi été démontré que certains pyréthriinoïdes bloquent les récepteurs GABA (Soderlund *et al.*, 2002), qui est un inhibiteur de neurotransmetteurs et donc ces pyréthriinoïdes prolongent d'autant plus l'influx nerveux en empêchant la boucle de rétroaction inhibitrice de neurotransmetteurs (figure 4). La différence de toxicité entre l'insecte et l'humain repose sur l'hétérogénéité des sous-unités  $\alpha$  des canaux sodique chez les mammifères alors que l'insecte n'a qu'un type de sous-unité, vulnérable aux pyréthriinoïdes (Hong et Ganetzky, 1994).



**Figure 4. Schéma d'une pompe à sodium et sites d'action des pyréthriinoïdes.**

Les symptômes neurotoxiques associés à l'intoxication aux pyréthriinoïdes du type I sont associés aux tremblements (T) tandis que ceux du type II sont associés au syndrome CS, soit à la salivation et à la choréo-athétose (caractérisée par des contractions musculaires irrégulières

et des mouvements incoordonnés) (Soderlund *et al.*, 2002). Les effets systémiques se produisent de 4 à 48 h après l'exposition. Ces effets ne sont pas persistants (Pauluhn, 1997).

Toutefois, il semble que l'effet neurotoxique ne se limite pas qu'à un effet systémique ponctuel. En effet, les pyréthriinoïdes peuvent avoir une influence discrète sur les étapes de croissance de l'organisme. Ces composés ont la capacité de traverser la barrière encéphalique pour engendrer des troubles neurologiques. Lorsque l'exposition se produit lors du développement, elle peut entraîner des malformations du système nerveux et conduire vers des déficits fonctionnels à long terme. Une étude de Sinha *et al.* (2006) a rapporté les effets développementaux des répulsifs à insectes contenant de l'alléthrine à 3,6% sur les rats, évaluant plusieurs étapes du développement, dont l'étape prénatale, postnatale et périnatale. L'exposition fut d'une durée de 8 h par jour durant la période pré/post et péri-natale d'une cinquantaine de jours, par inhalation. Des dommages oxydatifs, une augmentation de la peroxydation et une diminution du glutathion, d'antioxydants et de catalase ont été répertoriés dans certaines structures du cerveau, dont le cervelet, le cortex frontal et l'hippocampe. La faculté d'apprentissage a été réduite chez les rats. Ces résultats suggèrent que l'exposition à ce type de composé durant les étapes précoces de développement peut engendrer des déficits importants du système nerveux.

Des études de type épidémiologique ont aussi relié l'exposition aux pyréthriinoïdes à des effets neurologiques. Des associations entre l'exposition aux pyréthriinoïdes et des problèmes comportementaux ou de développement chez les enfants ont été rapportées notamment dans deux études épidémiologiques. Une étude transversale a évalué la présence d'une association entre les scores du Questionnaire sur les forces et les difficultés (SDQ) et la concentration urinaire de métabolites chez 779 enfants (Oulhote et Bouchard, 2013). Également, un retard de neurodéveloppement, évalué par le test de dépistage développemental de Denver (DST) chez l'enfant de 1 an, a été associé avec la concentration de métabolites urinaires de pyréthriinoïdes chez la mère durant la grossesse (Qi *et al.*, 2011). Toutefois, les mécanismes de ces effets ne sont pas encore circonscrits et beaucoup de recherche reste à réaliser.

### 1.3.2. Immunotoxicité

L'étude de Dilek et Muranli (2013) a montré, dans une expérience *in vitro*, que deux pyréthrinoïdes, la cyhalothrine et la cyperméthrine, entraînaient des effets cytotoxiques sur des cultures de lymphocytes. Ces résultats d'immunotoxicité sont appuyés par une étude d'Emara et Draz (2007) réalisée sur l'imiprothrine et la deltaméthrine montrant des effets immunotoxiques chez le rat exposé par inhalation à des aérosols plusieurs fois par jour durant deux à trente jours, tel qu'évalué par une réduction de la concentration de lymphocytes CD4 et CD8. Cette exposition entraînerait comme conséquences des changements au niveau de l'immunité générale (réponse lymphocytaire) et l'immunité non spécifique (activité phagocytaire des macrophages).

Des tests sur les paramètres immunologiques divers ont été réalisés par Hadnagy *et al.* (2003), par l'étude de la concentration d'immunoglobulines A, G, M et E, de récepteurs d'interleukines 2 et 6, des récepteurs de TNF (*Tumor Necrosis Factor*), ainsi que des marqueurs de défense dont le compte de lymphocytes (CD2, CD3), d'érythrocytes, de cellules T-helper (CD4), de cellules cytotoxiques (CD8), de cellules *Natural Killer* (NK) et du ratio CD4/CD8. De 24 à 72 h après exposition aux pyréthrinoïdes, la tendance générale était une diminution de ces valeurs. Cependant, il n'y avait plus trace de cette diminution 6 mois après l'exposition, ce qui indique la réversibilité des effets immunitaires (Hadnagy *et al.*, 2003).

### 1.3.3. Effets endocriniens et reproducteurs

Plusieurs études rapportent des effets endocriniens des pyréthrinoïdes (Ahmed, 2000; Kim *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2010). Il semble que les effets immunitaires et endocriniens soient interreliés : les effets endocriniens ayant un impact sur le système immunitaire par l'altération de la synthèse de cytokines et des médiateurs de l'apoptose (Ahmed, 2000). L'étude de Zhao *et al.* (2010) a d'ailleurs montré un potentiel estrogénique (estimé par l'expression des gènes PS2 et Era) et immunitaire (estimé par l'expression des gènes P53 et l'apoptose cellulaire).

Les effets endocriniens généralement rapportés sont des interactions avec des récepteurs des organes et structures sexuels. Kim *et al.* (2005) ont réalisé une étude chez des rats en

administrant un traitement sous-cutané de pyréthriinoïdes. Ils ont pu observer des effets estrogéniques chez des rats femelles et anti androgéniques chez des rats mâles exposés à une dose de plus de 200 mg/kg. Chez les rats femelles, ils ont en particulier observé que la perméthrine peut induire une réponse au niveau d'un récepteur utérin, le cABP-9k, agissant sur l'utérus. Chez les rats mâles, une diminution des tissus sexuels a été remarquée, tissus ayant une croissance dépendante des androgènes. L'effet néfaste observé correspond toutefois à une dose importante, non représentative d'une exposition environnementale.

En plus des effets sur les récepteurs hormonaux, la tétraméthrine a été identifiée comme responsable de la destruction de tubules séminifères chez le rat exposé par inhalation et de la diminution de l'activité spermatogène (Sakr, 2001). Chen *et al.* (2002) ont également montré une action de plusieurs pyréthriinoïdes sur le récepteur MCF-7 localisé au niveau des structures sexuelles. Ce résultat supporte l'idée que les pyréthriinoïdes produisent une réponse antagoniste aux récepteurs d'estrogènes. Dans l'étude, la perméthrine s'est avérée avoir le potentiel estrogénique le plus élevé parmi les différents pyréthriinoïdes évalués. Issam *et al.* (2009) a également montré que suite à l'administration sous-cutanée de faibles doses de deltaméthrine pendant 30 à 60 jours chez le rat, une baisse de production d'hormones folliculo-stimulante (FSH), d'hormone lutéinisante (LH) et de testostérone était observée, en plus d'une diminution de la synthèse des spermatozoïdes.

Zhang *et al.* (2008) ont également montré une diminution significative du nombre total de spermatozoïdes produits, de la motilité des spermatozoïdes formés et la formation de tubules séminifères anormaux dans les testicules chez des souris exposées par voie orale à 70 mg/kg/jour de *cis*-perméthrine durant 6 semaines par rapport aux souris contrôles (Zhang *et al.*, 2008). Les niveaux de testostérone dans les testicules et le plasma étaient également diminués.

Finalement, dans les études épidémiologiques de Meeker *et al.* (2008; 2009), les auteurs ont associé la présence de métabolites du 3-PBA et du DCCA avec une baisse de motilité des spermatozoïdes et une augmentation des dommages à l'acide désoxyribonucléique (ADN).

#### 1.3.4. Autres effets

Comme mentionnés précédemment, l'exposition aux pyréthrinoïdes a été associée à des dommages à l'ADN dans des études épidémiologiques transversales chez l'humain (Meeker *et al.*, 2008; 2009). Ces molécules ont d'ailleurs été identifiées comme pouvant entraîner des effets génotoxiques par certains auteurs (Dilek et Muranli, 2013; Tisch *et al.*, 2002; Vadhana *et al.*, 2010). Une exposition *in vitro* de cellules humaines nasales à la perméthrine a été associée à une réponse génotoxique significative qui était dépendante de la concentration (Tisch *et al.*, 2002) et montre ainsi un certain potentiel génotoxique de ces substances. Une vingtaine d'études ont d'ailleurs montré le potentiel génotoxique des insecticides pyréthrinoïdes *in vitro* (ATSDR, 2003; Tisch *et al.*, 2002). L'étude de Dilek et Muranli (2013) a d'ailleurs montré que certains pyréthrinoïdes entraînaient des effets génotoxiques sur des cultures de lymphocytes, tandis que des effets précoces de cardiotoxicité ont également été observés (Vadhana *et al.*, 2010). Les résultats ont indiqué que la perméthrine induisait des dommages oxydatifs aux bases de purine dans les cellules cardiaques.

D'autres indicateurs d'effets précoces ont été rapportés. Une association significative a été observée entre la régulation anormale du glucose et l'exposition ou manipulation de pyréthrinoïdes lors d'une étude cas-témoin chez plus de 3000 travailleurs dans des entreprises fabriquant des pesticides (Wang *et al.*, 2011).

**La plupart des données disponibles sur les effets toxiques des pyréthrinoïdes proviennent d'expériences chez des animaux exposés de façon aiguë ou subaiguë. Peu d'études épidémiologiques sont disponibles sur l'effet de l'exposition environnementale aux pyréthrinoïdes. Toutefois, une étude récente a notamment rapporté une association entre l'exposition aux pyréthrinoïdes chez les enfants et des effets neurologiques alors qu'une seconde étude épidémiologique a montré une association entre l'exposition aux pyréthrinoïdes chez l'homme et des effets sur les structures reproductrices. Étant donné**

**les effets rapportés chez l'animal et les associations observées chez l'humain, l'exposition doit être bien établie pour qu'une estimation du risque rigoureuse soit réalisée.**



## 1.4. Les pyréthrinoïdes les plus utilisés : la perméthrine et cyperméthrine

Actuellement, près de 20 ingrédients actifs de type pyréthrinoïdes sont utilisés (US. EPA, 2013). La perméthrine et la cyperméthrine sont les ingrédients actifs parmi les plus utilisés au Québec et aux États-Unis (Couture *et al.*, 2009; Fortin *et al.*, 2008; MDDEP, 2012; Spurlock et Lee, 2008) (figure 5).

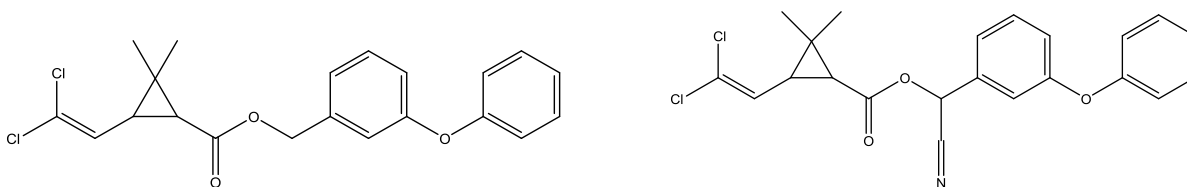


Figure 5. Structure moléculaire de la perméthrine et de la cyperméthrine

### 1.4.1. La perméthrine

La formule moléculaire de la cyperméthrine est  $C_{21}H_{20}Cl_2O_3$  et son poids moléculaire de 391,3 g/mol (Kaneko, 2010). La perméthrine est un pyréthrinoïde du groupe I. Son indice de toxicité létale ( $DL_{50}$ ) est estimé chez le rat entre 383-4892 mg/kg selon l'isomère et le sexe de l'individu (ASTDR, 2003; OMS, 2005; US. EPA, 2009). Elle a une durée de vie dans l'environnement d'une trentaine de jours (MDDELCC, 2014; Sage, 2014b; 2014c). La dernière évaluation de sa toxicité a été réalisée en 2009 lorsqu'un comité d'experts s'est penché sur la réévaluation de sa toxicité des normes associées (US. EPA, 2008; 2009).

À partir d'une étude de toxicité aiguë chez le rat, un NOAEL (*No-Observed Adverse Effect Level* - niveau le plus élevé sans effet néfaste observé) de 25 mg/kg/jour et un LOAEL (*Lowest-Observed Adverse Effect Level*- niveau le plus faible associé à un effet néfaste observé) de 75 mg/kg/jour ont été établis, le LOAEL correspondant à une observation clinique

de comportement agressif, mouvement anormal ou augmentation de la température corporelle. Une dose de référence (RfD) a été calculée en appliquant un facteur de sécurité de 100, pour tenir compte de la variabilité inter-espèce (10) et la variabilité inter-individuelle (10). La RfD représente la dose orale d'exposition que l'humain peut ingérer toute sa vie sans effet néfaste pour sa santé selon les données disponibles actuellement – nommée également DJA (dose journalière admissible). L'EPA a établi la RfD chronique et aiguë de la perméthrine à 0,25 mg/kg pc/j (US. EPA, 2009). Le système intégré d'informations sur le risque (IRIS) rapportait antérieurement une RfD de 0,05 mg/kg/j sur la base d'une étude chez le rat et avait identifié une augmentation de la masse du foie suite à l'administration orale de 25 mg/kg/j de perméthrine (IRIS, 1992). L'EPA a aussi établi une dose aiguë et chronique cutanée sans effet de 5 mg/kg/j et une dose sans effet par inhalation de 0,11 mg/kg/j, valeurs découlant également d'une étude chez le rat. Les valeurs de référence sont retrouvées dans le tableau 3.

Le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) a classé la perméthrine dans le groupe 3, parmi les substances présentement non classifiables quant à leur cancérogénicité (CIRC, 2014), tandis que le US. EPA a classifié la perméthrine comme une substance de groupe C, soit susceptible d'être cancérogène chez l'humain sur la base d'études animales (US. EPA, 2009). Le comité d'experts a donc estimé une dose présentant un excès de risque spécifique à  $9.6 \times 10^{-3}$  mg/kg/j.

#### 1.4.2. La cyperméthrine

La formule moléculaire de la cyperméthrine est  $C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$  et son poids moléculaire de 416,3 g/mol (Kaneko, 2010). La cyperméthrine fait partie du groupe II et possède un groupement halogéné. Son indice de toxicité létale ( $DL_{50}$ ) est estimé chez le rat à 247-309 mg/kg selon l'isomère et le sexe de l'individu (US. EPA, 2006), ce qui est beaucoup plus faible que pour la perméthrine et représente donc un degré de toxicité plus important.

À partir d'une étude de toxicité aiguë orale chez le rat, un NOAEL de 10 mg/kg/jour et un LOAEL de 50 mg/kg/jour ont été établis, le LOAEL correspondant à une observation clinique de neurotoxicité. Une dose de référence (RfD) aiguë a été calculée en appliquant un facteur de

sécurité de 100 et a été établie à 0,1 mg/kg/j (US. EPA, 2006). Un NOAEL de 6 mg/kg/jour a été observé lors d'une étude de toxicité chronique orale chez le chien et un LOAEL se situant entre 18-20 mg/kg/jour a été rapporté, en fonction des signes cliniques de neurotoxicité, de mortalité ou de diminution de poids corporel. Une dose de référence (RfD) chronique a été calculée en appliquant un facteur de sécurité de 100 et a été établie à 0,06 mg/kg/j (US. EPA, 2006). L'IRIS rapportait antérieurement une RfD de 0,01 mg/kg/j, sur la base d'une étude chez le chien et avait identifié des effets sur le système nerveux à 15 mg/kg/j (IRIS, 1990). L'EPA a aussi suggéré une dose par inhalation aiguë et chronique sans effet de 2,7 mg/kg/j, valeur découlant également d'une étude chez le rat. En lien avec sa cancérogénicité, la cyperméthrine a été classée dans le groupe C (US. EPA, 2006). Il n'y a toutefois à ce jour aucune proposition de dose associée à un risque cancérigène spécifique pour une exposition à vie.

#### **1.4.3. Les valeurs limites d'exposition actuelles en milieu de travail**

Il n'y a actuellement pas de valeurs limites d'exposition aux pyréthrinoïdes proposées pour le milieu de travail au Canada. Il n'y a donc pas de « Valeur d'exposition moyenne pondérée » (VEMP) proposée dans le Règlement sur la santé et sécurité du travail du Québec Il n'y a pas non plus de valeur moyenne d'exposition (VME) en milieu de travail. Il n'y a pas non plus de valeur limite dans l'air proposée par le *National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH)* (pas de *Recommended Exposure limit (REL)* ou de *Immediately Dangerous to Life or Health value (IDLH)*) ou par l'*American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH)* (pas de *8-h Time-Weighted Average-Threshold Limit Value (TWA-TLV)* ou de *TLV-Short-Term Exposure Limit (15 min STEL)*). À titre comparatif, les pyréthrines ont un NIOSH REL, un OSHA PEL et un ACGIH TLV-TWA de 5 mg/m<sup>3</sup> et un IDLH de 5,000 mg/m<sup>3</sup> (CDC, 2003). Le U.S. EPA a également établi des doses de référence par ingestion à ne pas dépasser (*Reference dose* ou RfD). Santé Canada a aussi établi des Limites maximales de résidu dans les aliments (LMR). Ces données sont compilées dans le tableau 2.

**Tableau 2. Valeurs de référence pour la perméthrine et cyperméthrine**

Pyréthri-noïdes à l'étude	Durée d'exposition	Valeurs de référence				
		Dose de référence (selon la voie d'exposition)			Concentrations de référence	
		Orale	Cutané	Inhalation	Milieu de travail	Aliments (LMR) <sup>c</sup>
<b>Cyperméthrine</b>	Aiguë	0,1 mg/kg/j <sup>a</sup>	ND	2,7 mg/kg/j	ND	
	Chronique	0,06 mg/kg/j <sup>a</sup>	ND	2,7 mg/kg/j	ND	0,1- 1 mg/kg
		0,01 mg/kg/j <sup>b</sup>				
<b>Perméthrine</b>	Aiguë	0,25 mg/kg/j <sup>a</sup>	5 mg/kg/j <sup>a</sup>	0,1 mg/kg/j <sup>a</sup>	ND	
	Chronique	0,25 mg/kg/j <sup>a</sup>	5 mg/kg/j <sup>a</sup>	0,1 mg/kg/j <sup>a</sup>	ND	0,05- 20 mg/kg
		0,05 mg/kg/j <sup>b</sup>				

<sup>a</sup> Selon RED, US. EPA.(2006; 2009)

<sup>b</sup> Selon IRIS (1990; 1992)

<sup>c</sup> Selon les données de l'Agence de réglementation pour la lutte anti-parasitaire (ARLA) (<http://pr-rp.hc-sc.gc.ca/mrl-lrm/results-fra.php>).

En somme, parmi les pesticides pyréthri-noïdes les plus utilisés, on retrouve la perméthrine et la cyperméthrine. Étant de groupe II, la cyperméthrine est plus toxique que la perméthrine et conduit à des symptômes différents. Il y a peu de valeurs limites d'exposition établies pour les pyréthri-noïdes, mais une dose de référence orale aiguë a été déterminée pour la perméthrine et cyperméthrine. L'utilisation importante et le degré de toxicité de ces pyréthri-noïdes démontrent la pertinence de mieux estimer l'exposition des travailleurs à ces substances.

## 1.5. La toxicocinétique comme étape critique au développement de biomarqueurs d'exposition

Afin de bien comprendre la relation entre la dose d'exposition et les effets potentiels, il est important de bien comprendre le devenir des pyréthrinoïdes dans l'organisme, c'est-à-dire la toxicocinétique (Guérin *et al.*, 2003). La toxicocinétique regroupe donc les processus d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'élimination du xénobiotique. Ce comportement dans l'organisme permettra d'établir les différents facteurs déterminant les profils observés des composés dans les matrices biologiques. Il est donc nécessaire de connaître la toxicocinétique de la substance pour pouvoir interpréter les données de biosurveillance et d'établir une stratégie efficace en surveillance biologique.

### 1.5.1. Absorption

L'absorption des pyréthrinoïdes peut se faire au niveau gastro-intestinal, au niveau pulmonaire ou cutané pour atteindre la circulation sanguine. Ce sont des molécules très peu hydrosolubles. Leur lipophilicité favorise leur transfert à travers les membranes épithéliales. Chez les travailleurs, les pyréthrinoïdes sont absorbés principalement par la voie respiratoire (sous forme de poussières ou d'aérosols) et par voie cutanée (INRS, 2010). Lors d'une exposition orale, entre 40 et 60 % de la dose est absorbée (INRS, 2010). Anadon *et al.* (1991) ont également estimé la biodisponibilité par voie orale de la perméthrine à 60% chez le rat. Toutefois, seulement une faible proportion est absorbée par la peau suite à une application locale, soit moins de 1% selon des études chez le rat (Meinking et Taplin, 1996; Van der Rhee *et al.*, 1989). À partir des quantités de métabolites retrouvées dans l'urine suite à une administration orale ou cutanée, Woollen *et al.* (1992) ont par ailleurs estimé la fraction absorbée de cyperméthrine à 36% de la dose administrée oralement et 1,2% de la dose appliquée sur la peau (Woollen *et al.*, 1992). Le US. EPA (2008) a déterminé à 5,7% la fraction d'absorption cutanée d'une dose de perméthrine. Peu de données sont rapportées pour une exposition par inhalation et aucune estimation de la fraction absorbée par cette voie n'a été publiée.

### 1.5.2. Distribution

Il y a peu de données dans la littérature scientifique sur la distribution des pyréthriinoïdes. Comme ces molécules sont lipophiles, elles ont la capacité de traverser les membranes, dont la barrière hémato-encéphalique. Suite à une exposition orale, ces molécules subiront un effet de premier passage au foie et se dégraderont en métabolites secondaires dans le foie plus rapidement. À partir de données provenant de résultats expérimentaux chez le rat exposé par voie orale à la deltraméthrine, l'équipe de recherche de Kim *et al.*, (2008) a estimé que 0,3% de la dose systémique absorbée atteignait le cerveau. Ces auteurs ont aussi montré une accumulation de la deltaméthrine dans les tissus adipeux, la peau et les tissus musculaires de cette substance chimique lipophile (quelques minutes) avec un relargage proportionnellement plus lent (heures à jours).

### 1.5.3. Métabolisme

La biotransformation est un processus de défense de l'organisme qui a généralement pour but de rendre les xénobiotiques plus hydrosolubles afin de les rendre facilement excrétables. Plusieurs réactions et mécanismes interviennent pour accomplir ce processus (figure 6). Les deux principales réactions de biotransformation des pyréthriinoïdes sont les phases I (oxydation, réduction et hydrolyse) et II (conjugaison). Les pyréthriinoïdes sont rapidement dégradés pour être transformés en acides carboxyliques, métabolites hydrosolubles pouvant être excrétés dans l'urine (Kühn *et al.*, 1999). Plus précisément, il y a un clivage hydrolytique du groupement ester, suivi d'une oxydation (Leng *et al.*, 2006a). Les pyréthriinoïdes sont métabolisés principalement dans le foie par l'intermédiaire d'une rupture de leur liaison ester (Scollon *et al.*, 2009). Ceux-ci sont dégradés soit par les estérases, principalement par les carboxylestérases humaines 1 et 2 (hCE1 et 2), ou par oxydation par le cytochrome P450 (CYP) humain, en particulier CYP 2C8, CYP 2C9, CYP 2C19 et CYP 3A4 (Crow *et al.*, 2007; Scollon *et al.*, 2009). Dans le cas de la perméthrine et cyperméthrine, ces molécules se scindent pour produire deux principaux métabolites, l'acide 3-phénoxybenzoïque (3-PBA) et l'acide 3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-diméthylcyclopropane-1-carboxylique (DCCA). Les métabolites générés ainsi sont alors conjugués et excrétés principalement dans l'urine au bout

de quelques jours (Eadsforth *et al.*, 1988; Kaneko et Miyamoto 2001; Kühn *et al.*, 1999; Leng *et al.*, 2006a; Tomalik-Scharte *et al.*, 2005; Wollen *et al.*, 1992).

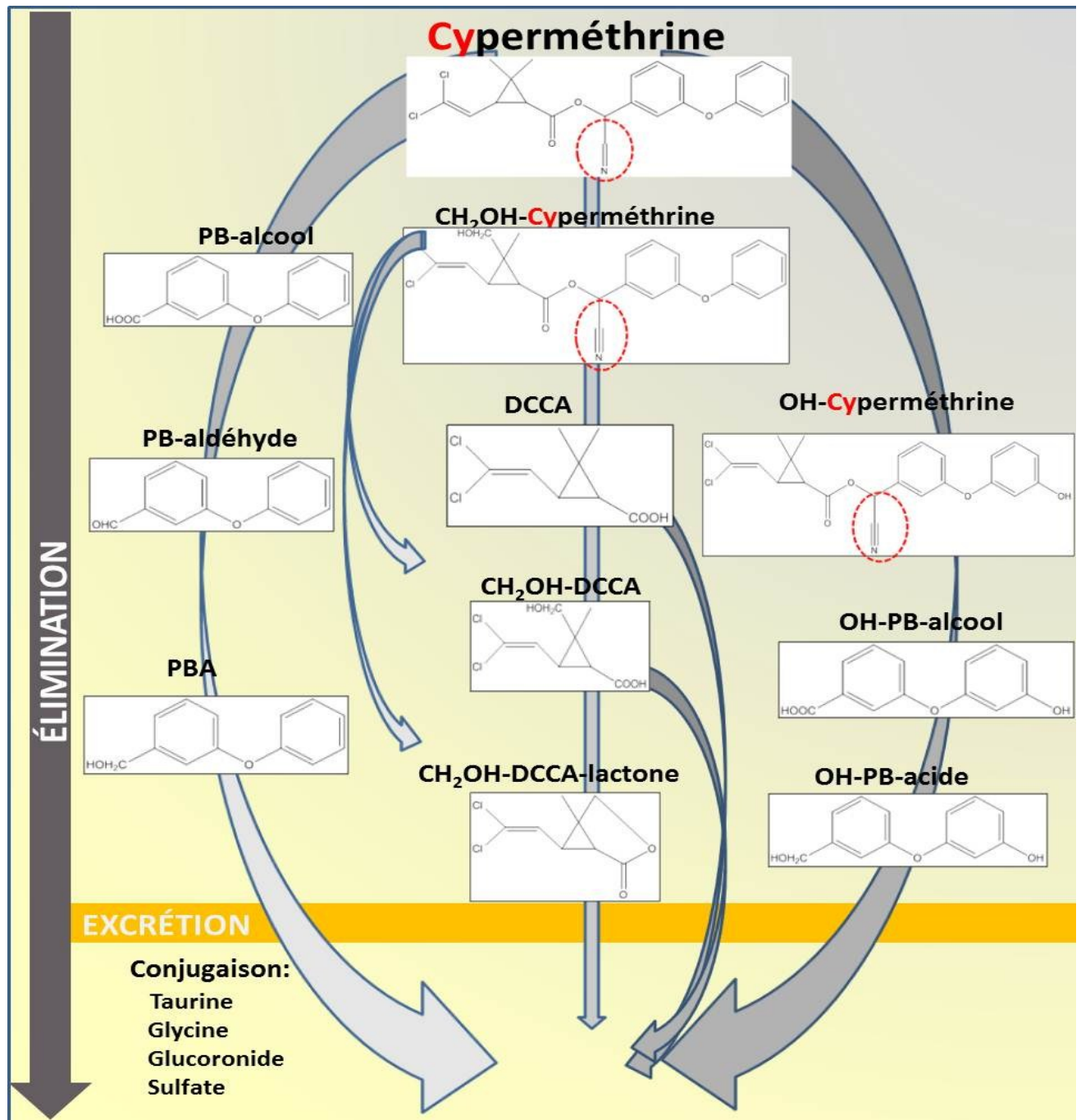


Figure 6. Métabolisme de la perméthrine et cyperméthrine.

De plus, il existe des différences inter-espèces connues au niveau du taux de métabolisme hépatique de pyréthriinoïdes (Scollon *et al.*, 2009). En effet, la clairance intrinsèque des pyréthriinoïdes chez le rat a été rapporté être de 5 à 10 fois supérieure à celle des microsomes humains, à l'exception de la *trans*-perméthrine, qui était de 45% plus élevée chez les humains (Scollon *et al.*, 2009).

Les études chez le rat ont également montré l'importance de documenter précisément la cinétique des stéréo-isomères, étant donné que la cinétique et la dynamique peuvent varier entre isomères (Zhao *et al.*, 2010). En particulier, il a été montré que l'isomère de conformation moléculaire *cis* se stockait davantage dans les tissus adipeux des rats que la forme *trans* (Gaughan *et al.*, 1977; Crawford *et al.*, 1981; Gotoh *et al.*, 1998 Woollen *et al.*, 1992). Aussi, la forme *trans* semble être métabolisée plus rapidement que la forme *cis* (Nishi *et al.*, 2006; Ross *et al.*, 2006), ce qui diminuerait donc son effet neurotoxique.

Dans une étude récente de Lavado *et al.* (2014) portant sur le métabolisme de la perméthrine, les chercheurs réitéraient que le modèle animal n'était pas un modèle précis. D'autres pyréthriinoïdes, dont la deltaméthrine, présentaient un métabolisme différent entre l'homme et l'animal, résultant de modulations différentes dans l'activité d'enzymes spécifiques (Godin *et al.*, 2006; 2007). Zhang *et al.* (2008) ont également rapporté que la perméthrine peut induire une toxicité reproductive mâle adulte de la souris en raison de l'isomère *cis* mais non pour le *trans*-isomère. Ces auteurs ont en particulier montré que l'activité hépatique de l'hydrolase microsomale envers la *trans*-perméthrine était près de 62 fois plus élevée que pour la *cis*-perméthrine, ce qui augmentait l'effet toxique général de la substance mère *cis* en diminuant son métabolisme. Lawrence et Casida (1982) ont d'ailleurs estimé que la conformation en *cis* nécessitait une dose de 2 à 80 fois plus faible que le *trans* pour causer l'effet toxique recherché.

#### 1.5.4. Élimination

L'excrétion est le processus d'élimination complète de la substance hors de l'organisme. Comme mentionné précédemment, l'excrétion des pyréthriinoïdes se fait principalement par



l'urine. La deuxième voie d'excrétion est l'élimination fécale. Près de 50 % de la dose administrée est éliminé sous forme de métabolites urinaires tandis que l'élimination fécale se situe entre 10 à 26 % de la dose absorbée (INRS, 2010). Une étude chez le rat a montré que la perméthrine dans le plasma avait une demi-vie de 9 à 11 h suite à une injection intraveineuse et de 12 à 18 h après une administration orale (Anadon *et al.*, 1991). Chez l'humain, des demi-vies d'élimination urinaires de 16 h et 7 h ont été rapportées pour les métabolites de la cyperméthrine après exposition orale et inhalation (Woollen *et al.*, 1992), ce qui est similaire aux résultats obtenus pour la cyfluthrine après inhalation  $\approx 7$  h (Leng *et al.*, 1997a). En ce qui concerne l'élimination complète après exposition topique, elle est estimée à moins d'une semaine selon une étude chez des volontaires exposés de façon contrôlée (Tomalik-Scharte *et al.*, 2005). Ces auteurs ont rapporté des demi-vies ( $t_{1/2}$ ) des métabolites de la perméthrine de 32 à 38 h et une excrétion quasi complète après une période de 168 h, son métabolisme étant plus rapide que son absorption cutanée (Tomalik-Scharte *et al.*, 2005). L'excrétion urinaire maximale était atteinte plus tardivement suite à une exposition cutanée comparée à une exposition orale (soit entre 12 et 20 h après contact cutané) (Tomalik-Scharte *et al.*, 2005). Pour la cyperméthrine, Woollen *et al.* (1992) ont comparé l'élimination après exposition orale et cutanée. Après administration orale, les taux d'excrétion urinaires maximaux étaient observés entre 8 et 24 h, alors qu'après administration cutanée les taux d'excrétion urinaire maximaux étaient observés entre 12 et 36 h.

**En somme, à ce jour, les données cinétiques sur la perméthrine et cyperméthrine les plus citées sont surtout fondées sur des études animales (Anadon *et al.*, 1991; Sidon *et al.*, 1988; Crawford *et al.*, 1981) alors que des différences dans le métabolisme avec l'humain ont déjà été mentionnées. Les données humaines sont limitées. Woollen *et al.* (1992) ont étudié le profil temporel de la cyperméthrine dans l'urine, mais aucun profil sanguin n'a été établi. Tomalik-Scharte *et al.* (2005) ont documenté le profil temporel de l'excrétion urinaire de DCCA (la somme des isomères *cis-et trans*-DCCA) chez des patients traités par voie cutanée à la perméthrine; cependant, les données orales correspondantes font défaut et les profils d'élimination des deux isomères de DCCA diffèrent. Le profil**

temporel sanguin de la perméthrine a également été documenté, mais il a été évalué chez un patient en état d'ébriété (Gotoh *et al.*, 1998) alors que l'alcool peut interférer avec le métabolisme de certains composés chimiques (Choi *et al.*, 2002; Gueguen *et al.*, 2006). Les temps de demi-vie rapportés dans les différentes études sont similaires, de l'ordre d'une journée de travail, pour les différentes voies. Toutefois, aucune étude n'a fourni un profil temporel complet de l'élimination d'un pyréthriinoïdes par voie orale chez l'humain en identifiant des métabolites spécifiques multiples (tels que les trois biomarqueurs *cis*-DCCA, *trans*-DCCA et 3-PBA) dans l'urine et le sang et en séparant la mesure des isomères.

## 1.6. La biosurveillance de l'exposition

Une des approches reconnues scientifiquement pour estimer l'exposition aux pyréthriinoïdes consiste à mesurer les concentrations de métabolites dans des matrices biologiques des individus. La mesure de ces métabolites dans des matrices accessibles peut ainsi servir de biomarqueurs d'exposition. Les biomarqueurs d'exposition fournissent des informations sur l'exposition aux produits chimiques, sur les changements temporels et la variabilité populationnelle (US. EPA, 2014). Ces biomarqueurs d'exposition peuvent être des composés chimiques ou leurs métabolites (US. EPA, 2014a). Comme l'estimation de l'exposition par des mesures des concentrations externes et des taux de contact est complexe (voire section 1.2), la biosurveillance s'avère un moyen plus adéquat pour quantifier l'exposition réelle.

### 1.6.1. Principe

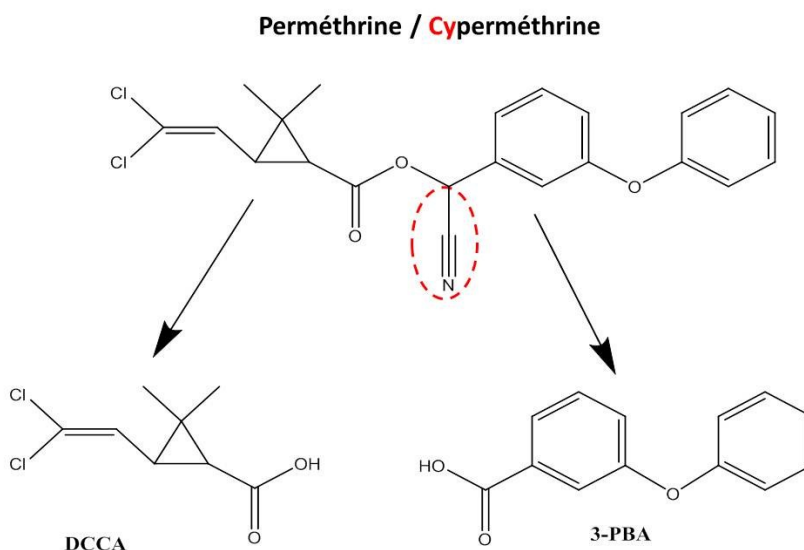
Un bon biomarqueur d'exposition n'est pas invasif, il est spécifique, est lié à une méthode sensible, car il peut se retrouver en concentrations minimales dans les matrices biologiques de la population (Barr *et al.*, 2006). Les biomarqueurs d'exposition reflètent l'exposition interne et donc les doses réellement absorbées (Vermeulen *et al.*, 2002). Ils permettent de mettre en évidence une exposition passée ou présente. La mesure des biomarqueurs reflète l'exposition totale par les différentes voies d'entrée. En connaissant les paramètres de la relation entre l'exposition et les biomarqueurs, il est possible de relier les biomarqueurs à l'exposition et vice versa. Les biomarqueurs s'avèrent utiles pour évaluer l'exposition à un xénobiotique. La biosurveillance est d'ailleurs utilisée par plusieurs organismes gouvernementaux pour évaluer l'exposition aux contaminants environnementaux, publié entre autres dans le quatrième Sondage américain sur la santé (NHANES) (CDC, 2009) et l'Enquête canadienne sur les mesures de santé (ECMS) (Santé Canada, 2013).

La surveillance biologique de l'exposition aux pyréthriinoïdes est généralement effectuée par la mesure des métabolites dans l'urine. En effet, les pyréthriinoïdes se retrouvent en quantités appréciables dans l'urine (matrice non invasive) et sont détectables dans le sang. Les pesticides parents étant rapidement dégradés dans l'organisme, ce sont les produits

d'élimination qui sont mesurés. De 40% à 50% de ces métabolites sont excrétés dans l'urine (INRS, 2010; Leng *et al.*, 1997a; 1997b), ce qui en fait une excellente matrice à utiliser en biosurveillance pour ces contaminants.

### 1.6.2. Biomarqueurs d'exposition à la perméthrine et cyperméthrine

Il est scientifiquement admis que la mesure d'acide 3-phénoxybenzoïque (3-PBA) et l'acide *cis* ou *trans*-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-diméthylcyclopropane-1-carboxylique (*cis/trans*-DCCA) dans l'urine est utile pour estimer l'exposition à la perméthrine et cyperméthrine (figure 7). Ce sont des métabolites urinaires stables (Leng *et al.*, 1997a; Woollen *et al.*, 1992).



**Figure 7. 3-PBA et DCCA, principaux biomarqueurs urinaires de la perméthrine et cyperméthrine.**

Ces métabolites sont toutefois non spécifiques à un pyréthrianoïde (ils peuvent être générés par plusieurs pyréthrianoïdes). Pour le 3-PBA, les composés précurseurs sont la deltaméthrine, la cyperméthrine, la fenvalérate, la perméthrine, la phénothrine, la cyhalothrine et pour le

*cis/trans*-DCCA, ce sont la cyperméthrine, la perméthrine et la cyfluthrine (tableau 3). Deux facteurs sont à prendre en compte pour l'interprétation adéquate des données de biosurveillance impliquant l'utilisation de ces biomarqueurs d'exposition : son éventuelle non spécificité et le fait qu'ils ne permettent pas de connaître la portion relative de chaque source d'entrée.

**Tableau 3. Récapitulatif des métabolites urinaires utilisés en biosurveillance de l'exposition en fonction des composés mères.**

(selon Barr *et al* (2010) et Wielgomas *et al.* (2013))

Pyrethrinoïdes	Métabolites à l'étude		Autres métabolites urinaires terminaux
	Précurseur de 3-PBA	Précurseur de DCCA	
Alléthrine	X		
Cyfluthrine		X	4F3PBA
Cyhalothrine	X		
Cyperméthrine	X	X	
Deltaméthrine	X		DBCA
Esfenvalerate	X		
Etofenprox	X		
Fenvalerate	X		
Perméthrine	X	X	
Phénothrine	X		
Pralléthrine			CDCA
Resméthrine	X		
Tétraméthrine			CDCA
Transfluthrine	X		

### 1.6.3. Méthode analytique en spectrométrie de masse pour la quantification des métabolites de pyréthrinoïdes

Plusieurs méthodes analytiques ont déjà été développées pour identifier et quantifier les métabolites des pyréthrinoïdes. Les méthodes les plus courantes utilisent la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS) (Olson *et al.*, 2004) ou la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) (Leng et Gries, 2006b). Il n'y a toutefois à ce jour aucune méthode publiée utilisant la nouvelle technologie HPLC couplée à la spectrométrie de masse quadripolaire à temps de vol (HPLC-Q/TOF). Cette dernière semble être une méthode prometteuse ultra-spécifique pour la mesure de faibles concentrations de métabolites dans une matrice biologique, comme celles des pyréthrinoïdes. La spectrométrie de masse à temps de vol permet de détecter et d'identifier des molécules en fonction de leur rapport masse/charge ( $m/z$ ) et de caractériser leur structure chimique. L'instrument comporte une source d'ionisation suivie d'un ou plusieurs analyseurs, d'un détecteur et finalement d'un système informatique traitant le signal (figure 8).

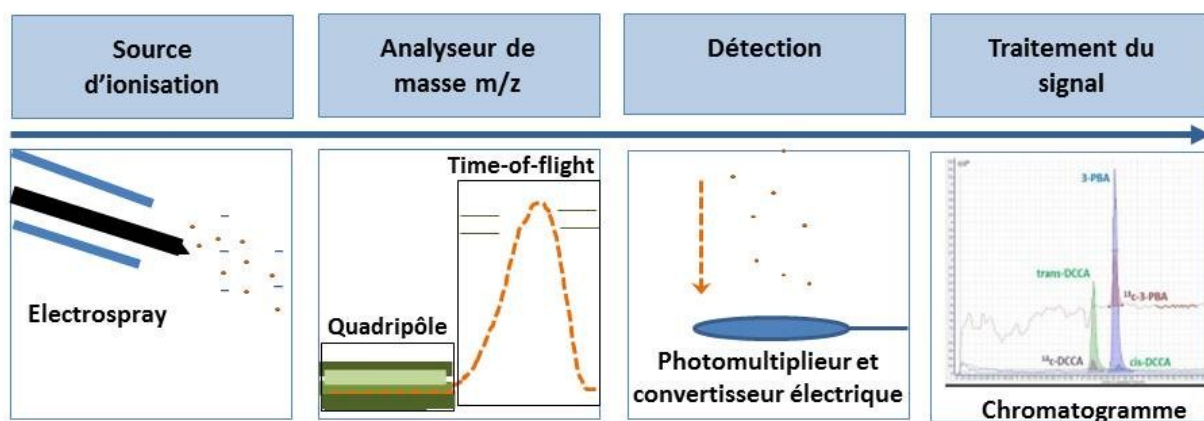


Figure 8. Schéma de la spectrométrie de masse quadripolaire à temps de vol (Q/TOF)

Le Q/ToF offre l'avantage d'avoir une très haute résolution et de très faibles limites de détection. Les principes théoriques de base reposent sur l'identification et la quantification d'un ion selon le rapport de sa masse sur sa charge. Pour se faire, l'instrument Q/ToF ionise une molécule et la dirige vers un système d'électrodes parallèles qui permettra seulement à l'ion ayant le bon rapport masse/charge d'atteindre l'extrémité. Une cellule de collision le fragmentera ensuite à l'aide d'un gaz pour que l'ion choisi se brise en fragments spécifiques selon sa structure. La spectrométrie à temps de vol (Time of Flight) accélère ces ions par un champ électrique à une énergie cinétique initialement égale. La vitesse des ions dépendra alors du rapport masse/charge. Le système mesure le temps que prend la particule chargée à atteindre le détecteur. Désormais automatisée, la spectrométrie de masse s'avère un allié utile en détection de biomarqueurs. De plus, plusieurs études (tableau 4) montrent des limites de détection ne permettant pas de quantifier des niveaux biologiques populationnels de ces biomarqueurs. Il y a donc un besoin de développer des méthodes analytiques plus sensibles.

#### 1.6.4. Expression des données de surveillance biologique obtenues

Même si les métabolites de pyréthrinoïdes sont facilement quantifiables dans l'urine, il ne faut pas omettre de prendre en considération la variabilité inter et intra-individuelle de certains facteurs physiologiques se reflétant dans les données urinaires. L'expression des données en concentration volumique ( $\mu\text{g/L}$ ) est souvent utilisée dans la littérature pour rapporter l'excrétion des métabolites urinaires des pyréthrinoïdes (Arrebola *et al.*, 1999; Couture *et al.*, 2009; Fortin *et al.*, 2008a; Leng *et al.*, 2006b; Schettgen *et al.*, 2002b). On retrouve également les données exprimées en concentrations ajustées par la créatinine ( $\mu\text{g/g}$ ) (Barr *et al.*, 2010; Hardt et Angerer, 2003; Le Grand *et al.*, 2012; McKelvey *et al.*, 2013; Panuwet *et al.*, 2008; Thiphom *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2007; Wielgomas *et al.*, 2013). Les concentrations volumiques de molécules chimiques éliminées par filtration glomérulaire ou sécrétion tubulaire active sont influencées par plusieurs facteurs, dont la transpiration, l'absorption d'eau, les maladies. Comme l'humain est sujet à un cycle circadien influencé par des paramètres physiologiques mais également comportementaux (alimentation), l'ajustement à la créatinine, étant une molécule endogène associée à la fonction rénale, a déjà été démontré

comme un ajustement souhaitable pour certains contaminants environnementaux, dont le 1-hydroxypyrene (Viau *et al.*, 2004). Des variabilités de 500% ont été détectées entre un ajustement à la créatinine et une concentration volumique (Fortin *et al.*, 2008b). Aussi, un ajustement des taux d'excrétion de pesticides par le poids corporel est une alternative intéressante et techniquement simplifiée qui a déjà été utilisée auparavant (Couture *et al.*, 2009). L'ajustement du taux d'excrétion au poids corporel pourrait être utilisé pour faciliter la comparaison inter-individuelle alors que l'ajustement à la créatinine serait également bénéfique pour diminuer la variabilité intra-individuelle.

### 1.6.5. Importance du profil temporel

De plus, le moment d'échantillonnage pourrait également induire un biais d'estimation de l'exposition à partir des mesures de biomarqueurs. Même si les quantités excrétées de métabolites sont ajustées aux quantités excrétées de créatinine, si l'échantillonnage est réalisé sur une période de 24 h, l'extrapolation de la concentration pourrait être faussée à cause de l'échelle temporelle trop longue sachant que les pyréthrinoïdes ont de courtes demi-vies. Le prélèvement temporel de plusieurs échantillons de miction (mesures sériées) viendrait donc pallier à cette variabilité et entraînerait une estimation plus précise de l'exposition réelle. Comme rapporté par Barr *et al.* (2006), un nombre adéquat d'échantillons par sujet devrait être collecté pour bien interpréter les données de biosurveillance de l'exposition.

Bien que les résultats de quelques études citées dans la section suivante aient montré une absorption plus importante de pyréthrinoïdes chez des travailleurs exposés comparés à un groupe contrôle, la surveillance biologique a été obtenue principalement à partir de mesures ponctuelles (une collection) ou une collecte urinaire de 24 h. Cependant, le recours à des prélèvements d'échantillons d'urine ponctuels dans l'évaluation de l'exposition aux pesticides non persistants a été questionné (Arcury *et al.*, 2006, Barr *et al.*, 2007). L'utilisation de mesures répétées chez les travailleurs exposés aux pesticides est recommandée, car les niveaux urinaires peuvent varier sensiblement au cours de la journée et de la semaine de travail.



### **1.6.6. Les niveaux de biomarqueurs d'exposition observés dans la population générale et les travailleurs**

Pour la population générale, les niveaux de biomarqueurs d'exposition aux pyréthriinoïdes ont été associés principalement à un apport alimentaire. Les valeurs biologiques de métabolites de pyréthriinoïdes connues dans la population sans exposition professionnelle sont présentées dans le tableau 4. Fortin *et al.* (2009) ont procédé à des analyses de métabolites urinaires de pyréthriinoïdes et de pyréthrine chez deux sous-groupes de la population québécoise, rurale et urbaine. Les adultes et enfants de la région rurale montraient des niveaux d'excrétion de ces métabolites plus élevés que les sujets habitant en milieu urbain.

Les données de surveillance biologique de l'exposition aux pyréthriinoïdes publiées en milieu de travail au Québec sont absentes. Les principales études publiées sur la surveillance biologique de l'exposition aux pyréthriinoïdes chez les travailleurs ont été menées au Japon, en Thaïlande, en Allemagne et aux États-Unis (Arcury *et al.*, 2006;. Hardt et Angerer, 2003; Leng *et al.*, 1996; Panuwet *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2007) (tableau 5). Les rares données disponibles réalisées lors d'études exclusivement chez les individus exposés professionnellement montrent des moyennes géométriques (MG) de concentrations urinaires de métabolites de pyréthriinoïdes et 95<sup>e</sup> centile supérieurs aux données provenant de la population générale.

**Tableau 4. Résumé des concentrations de trois biomarqueurs (3-PBA, *cis*-DCCA et *trans*-DCCA) d'études portant sur des données provenant de la population générale.**

Auteurs**	n	Excrétion de métabolites (µg/g de créatinine)*								
		3-PBA			<i>trans</i> -DCCA			<i>cis</i> -DCCA		
		MG	Médiane	95 <sup>e</sup> centile (max)	MG	Médiane	95 <sup>e</sup> centile (max)	MG	Médiane	95 <sup>e</sup> centile (max)
Barr <i>et al.</i> , (2010)	3031-3046	0,32	0,29	3,35	ND	<LOD	2,62	ND	<LOD	0,90
CDC (2009)	2524-2538	0,32	0,28	3,10	ND	<LOD	2,55	ND	<LOD	1.12
ECMS (2011) cycle 2	2024-2037	0,28	0,20	ND	0,29	0,22	6,80	0,10	0,09	1,10
ECMS (2009) cycle 1	5417-5457	0,25	0,19	3,0	0,20	0,17	2,50	0,12	0,09	ND
Hardt et Angerer, (2003)	1177	NA	NA	NA	NA	0,22	1,40 (17,13)	NA	<LOD	0,58 (9,06)
Le Grand <i>et al.</i> , (2012)	39	0,69	0,55	1,32	0,45	0,32	0,98 (1,48)	0,21	0,20	0,43 (0,50)
McKelvey <i>et al.</i> , (2013)	1452	NA	0,75	4,51	NA	<LOD	6,66	NA	NA	NA
Wielgomas <i>et al.</i> , (2013)	132	0,33	0,19	0,95 (1,83)	ND	<LOD	0,17 (0,27)	ND	<LOD	0,17 (0,51)

\*Arrondi à 2 décimales

MG : Moyenne géométrique

ND : rapporté comme donnée non disponible par les auteurs

NA : non considéré dans le projet de recherche

\*\* Seules les données exprimées en µg/g de créatinine sont rapportées ici. Les études exprimées uniquement en µg/L ont été retirées à des fins comparatives: Arrebola *et al.*, 1999; Couture *et al.*, 2009; Fortin *et al.*, 2008; Leng *et al.*, 2006b. Schettgen *et al.*, 2002.

**Tableau 5. Recensement des données de surveillance biologique de l'exposition chez les travailleurs agricoles.**

Auteurs	Année	n	Pays	Considérations (X)		Résultats de l'excrétion (µg/g de créatinine)*		
				Analyse de plus d'un bio-marqueur	Ajustement sur l'excrétion de la créatinine	max	MG	95 <sup>e</sup> centile
Hardt <i>et al.</i>	2003	24	Allemagne	X	X	3-PBA=28,5 DCCA tot=1,9	3-PBA=1,8 DCCA tot =0,6	NA
Hardt et Angerer	2003	36	Allemagne	X	X	DCCA tot=92,0 3-PBA=57,7	NA	NA
Panuwet <i>et al.</i>	2008	167	Thaïlande	X	X	3-PBA =21,0 tDCCA =49,2 cDCCA =5,3	3-PBA =0,86 tDCCA =ND cDCCA =ND	3-PBA =7.4 tDCCA =11.1 cDCCA <LOD
Thiphom <i>et al.</i>	2014	100	Thaïlande		X	3-PBA=256,2	NA	NA
Wang <i>et al.</i>	2007	144	Japon		X	3-PBA =12,3	NA	NA

\*Arrondi à une décimale

ND : reporté comme donnée non disponible par les auteurs

NA : non considéré dans le projet

### 1.6.7. Biomarqueurs d'exposition et valeurs de référence biologiques

La concentration interne reflétant les doses réellement absorbées, il est possible d'estimer le niveau de biomarqueurs dans l'organisme équivalent à une dose de référence chronique ou aiguë. La dose de référence est une dose par ingestion en dessous de laquelle le risque d'effet néfaste devrait être négligeable sur la base des données disponibles. Ces valeurs de référence sont mises à jour périodiquement par les organismes gouvernementaux en fonction des nouvelles données accessibles. Expérimentalement, il est possible de dériver des valeurs de référence biologique correspondant à la dose de référence. La surveillance biologique ne permettra alors pas seulement d'estimer l'exposition, mais bien d'évaluer si l'exposition est actuellement associée à un risque identifié pour la santé selon les organisations reconnues. Il n'y a actuellement aucune valeur de référence biologique (concentration biologique maximale acceptable) proposée pour les pyréthrinoïdes. Cependant, cette approche est déjà utilisée pour certains autres contaminants.

L'INSPQ a documenté 68 substances retrouvées dans le sang, le plasma ou l'urine et a établi des niveaux biologiques devant obligatoirement être déclarées par les laboratoires (INSPQ, 2004). De plus, l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et sécurité au travail (IRSST) a déterminé des indices biologiques d'exposition (IBE) (valeurs limites biologiques à ne pas dépasser) pour 29 substances chimiques, pour la plupart des métaux ou des contaminants volatils, mais n'inclut pas les pyréthrinoïdes (IRSST, 2012). Les valeurs de référence établies correspondent à la concentration biologique moyenne d'une population de travailleurs exposés à des concentrations de contaminants équivalents aux normes pour une exposition de 8 heures par jour, 5 jours par semaine.

**En résumé, les biomarqueurs d'exposition provenant de la dégradation de la perméthrine et cyperméthrine, le 3-PBA, le *cis*-DCCA et le *trans*-DCCA, se retrouvent en grande proportion dans l'urine. Cette dernière est donc la matrice à choisir dans une stratégie de biosurveillance. Plusieurs études montrent que la façon d'exprimer les**

données de surveillance biologique (concentrations ( $\mu\text{g/L}$ ,  $\mu\text{g/g}$  créatinine) ou taux d'excrétion), est importante dans l'interprétation des données. Par ailleurs, des données de biosurveillance provenant de la population générale sont disponibles, mais peu d'études en milieu de travail agricole ont été réalisées, et aucune au Québec. Les niveaux d'exposition semblent plus élevés chez les travailleurs agricoles comparés à la population générale selon les données publiées. L'élimination rapide du pesticide, ainsi que la variation intra-individuelle permettent difficilement d'évaluer l'exposition individuelle par une mesure ponctuelle. Un profilage temporel est requis. Il n'existe actuellement pas de valeur de référence biologique (valeur limite biologique) de biomarqueurs à surveiller pour prévenir les risques liés à une exposition complexe aux pyréthrinoïdes.

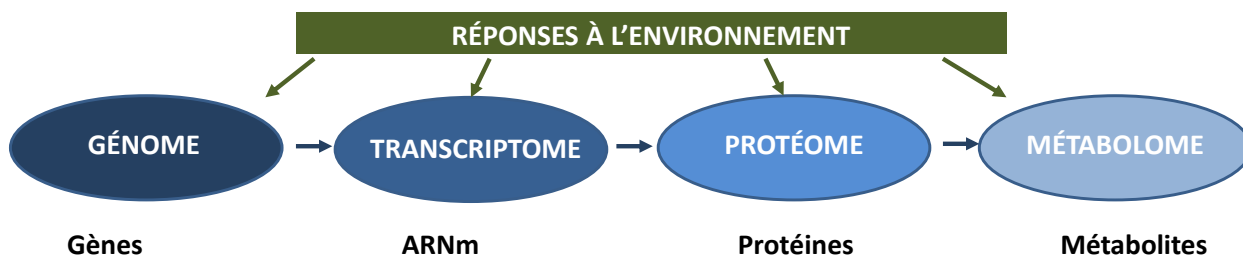
## 1.7. Biomarqueurs d'effets précoces et la métabolomique

Les biomarqueurs d'exposition ne sont pas les seuls biomarqueurs pouvant être utiles en analyse de risque. Il y a trois types de biomarqueurs selon l'utilisation qu'on en fait : les biomarqueurs de susceptibilité, les biomarqueurs d'exposition et les biomarqueurs d'effets (OMS, 2011; US. EPA, 2014). Les biomarqueurs d'effets sont des indicateurs d'un changement dans la fonction biologique en réponse à une exposition aux produits chimiques (US. EPA, 2014). Norberg (2010) définit les biomarqueurs d'effets comme *des représentants de changements dans l'expression d'une molécule endogène dans le sang ou l'urine associés à un effet précoce sur la santé (possiblement néfaste; critique) ou un effet critique clinique* [traduction libre].

La quantification des biomarqueurs d'effet est un aspect intéressant pour documenter les expositions faibles mais chroniques permettant d'estimer la différence de concentrations des molécules naturellement produites par l'organisme, dont les protéines et enzymes, et ce, en réponse à un stress. Les changements dans la concentration de ces métabolites expriment des modifications de la régulation cellulaire et des processus métaboliques. Un impact sur le métabolome constitue une indication intermédiaire d'effets. Un biomarqueur d'effet métabolomique est un indicateur précoce qui se manifeste généralement avant l'apparition de signes ou symptômes cliniques observables. L'étude des effets sur le métabolome permettrait alors d'anticiper les impacts potentiels sur la santé. Cependant, rares sont les études de changements précoces métaboliques animales associés à l'exposition à des pyréthrinoïdes (Asari *et al.*, 2012; Hernandez-Moreno *et al.*, 2010, Wang *et al.*, 2013). Les études disponibles concernent surtout des changements au niveau des concentrations d'acétylcholinestérase. Cette dernière est l'enzyme qui dégrade l'acétylcholine, un neurotransmetteur. L'inhibition de l'acétylcholinestérase conduit à un prolongement de l'action de l'acétylcholine au niveau nerveux (US. EPA, 2000). Une diminution d'acétylcholinestérase n'est toutefois pas inévitablement considérée comme un effet néfaste, mais bien comme une réponse adaptative à

un stress associé à certaines conséquences nuisibles (Carlock *et al.*, 1999; US. EPA, 2000). Les rares données humaines disponibles sur les biomarqueurs d'effets des pyrethrinoïdes se concentrent sur les modifications d'enzymes et hormones dans des matrices facilement accessibles comme le sang ou l'urine, reflétant des changements au niveau physiologique (Emara et Draz, 2007, Meeker, 2008; 2009, Bonvallot *et al.*, 2013).

La métabolomique identifie et quantifie quant à elle les composantes finales de la chaîne de réaction métabolique biologique, observables dans les matrices biologiques et les tissus (Krug *et al.*, 2012) (figure 9). La métabolomique est la science reliée à l'identification et la quantification non sélective de tous les métabolites d'un système biologique, ce qui est en étroite relation avec l'expression de son phénotype (Dumas, 2012; Fiehn *et al.*, 2000). Il est ici question des petits métabolites, dont les acides aminés, protéines ou enzymes. Il est désormais envisageable de relier les effets toxiques de contaminants ou maladies avec des profils métabolomiques précis (Beger *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2011). Il n'y a pas de banque de données actuellement disponible, mais l'élargissement de la recherche en métabolomique permet de croire qu'il s'agit d'une avenue prometteuse.



**Figure 9. Les étapes conduisant à l'effet sur le métabolome.**

Des études ont déjà été réalisées sur la réponse métabolique non sélective à la cyperméthrine chez les poissons en utilisant une dose sub létale (Carriquiriborde *et al.*, 2012). Une exposition subchronique à la deltaméthrine chez le rat a été aussi réalisée démontrant des baisses statistiquement significatives de lactate et d'alanine urinaire (Wang *et al.*, 2013). Chez la femme enceinte, l'exposition à un ensemble de pesticides a été associée à des changements au

niveau de la glycine, thréonine, lactate, citrate et glycérophosphocholine urinaire (Bonvallot *et al.*, 2013). Toutefois, on ignore toujours les différences de profil métabolomique chez l'humain causées par l'exposition aux pesticides pyréthriinoïdes.

La résonance magnétique nucléaire  $^1\text{H}$  (NMR) est une technique efficace et rapide pour quantifier les métabolites dans un échantillon (Silverstein *et al.*, 2005). Avec plus de 1700 publications éditées dans les 10 dernières années utilisant la résonance magnétique à des fins d'analyses métabolomiques, cette technique est scientifiquement largement acceptée. En chimie organique, la NMR est devenue un outil de routine pour identifier les produits de réactions. C'est une technique de spectroscopie basée sur l'absorption d'énergie. Les spectres produits offrent des informations qui peuvent être utilisées pour déterminer la structure de la molécule. En NMR, un noyau avec une masse impaire, dont le  $^1\text{H}$ , acquiert une oscillation suite à l'absorption d'énergie. Les oscillations de la molécule sont suffisamment différentes pour que les spectres soient particuliers à un élément précis (Carey, 2006). Cet appareil est de plus en plus utilisé en tant que méthode pour l'évaluation de la toxicité et la caractérisation de nouveaux biomarqueurs (Lin *et al.*, 2006) en plus d'être utilisé pour le développement de patrons de reconnaissance de lésions (Holmes *et al.*, 1998a; 1998b) et nouvellement pour la métabolomique après exposition professionnelle à des contaminants (Kuo *et al.*, 2012)

**Il y a peu de données humaines sur les biomarqueurs d'effets des pyrethinoïdes. L'exposition à un ensemble de pesticides a été associée à des changements métabolomiques. Toutefois, on ignore toujours les différences de profil métabolomique chez l'humain causées par l'exposition spécifique aux pesticides pyréthriinoïdes.**



# 1.8. Le projet de thèse

## 1.8.1. Originalité du projet

L'exposition est l'un des deux volets à estimer pour caractériser le risque pour la santé relié à un contaminant. Les pyréthriinoïdes étant des contaminants pouvant présenter une toxicité selon la dose absorbée et ayant une utilisation répandue touchant autant la population générale que les travailleurs, il devient prioritaire de surveiller leur exposition. Une connaissance approfondie de la toxicocinétique du contaminant dans l'organisme permet une meilleure interprétation des données de biosurveillance. Les données toxicocinétiques permettent d'établir les vitesses d'absorption, les temps pour atteindre les niveaux maximum, les vitesses d'élimination post-exposition ainsi que l'impact de la variabilité biologique sur les niveaux de biomarqueurs observés et des différences de profils temporels selon la voie d'exposition. Ces données sont nécessaires à connaître pour évaluer l'exposition. L'établissement du profil sanguin permettra de documenter des paramètres cinétiques régissant le profil urinaire observé. Les études actuelles concernant la toxicocinétique des pesticides pyréthriinoïdes sont réalisées principalement sur des animaux, alors qu'il a été montré que l'animal n'est pas un bon modèle pour décrire le métabolisme et l'élimination de bon nombre de composés à cause de la différence des métabolites formés et des proportions respectives de ces métabolites retrouvés dans l'urine.

Aussi, dans plusieurs études, des collectes urinaires ponctuelles ou une seule collecte sur 24 h ont été effectuées, ce qui n'informe pas adéquatement sur le profil temporel des biomarqueurs d'exposition d'intérêt étant donné que les pyréthriinoïdes et leurs métabolites ont des demi-vies très courtes et que la variation intra-individuelle est importante. C'est un moyen de caractériser l'exposition dans un contexte agricole mais qui ne reflète pas nécessairement l'exposition maximale à laquelle le travailleur est exposé, un aspect nécessaire à connaître pour bien évaluer le risque associé. Le suivi d'un seul biomarqueur est également problématique à cause du manque de spécificité relié à plus d'une molécule mère. Une bonne stratégie de biosurveillance doit donc prendre en compte tous ces facteurs.

De plus, l'exposition aux pyréthriinoïdes en milieu professionnel agricole québécois, voire canadien n'a actuellement pas été documentée. Pour bien caractériser le risque en milieu de travail associé à l'exposition à ces pesticides, l'estimation de l'exposition est donc nécessaire, ainsi que l'évaluation des paramètres professionnels ou physiologiques associés à une plus grande exposition.

Finalement, les effets d'une exposition chronique à de faibles doses sont difficiles à documenter. Une étude exploratoire en métabolomique suite à une exposition faible mais constante, comme c'est le cas chez des travailleurs, peut renseigner sur les indicateurs de toxicité chronique et d'identifier des biomarqueurs d'effets. Toutes ces considérations vont donc aider à renforcer les données reliées à l'analyse de risque des pesticides pyréthriinoïdes.

### 1.8.2. Objectifs

**L'objectif général du présent projet est d'appliquer une approche toxicocinétique pour l'évaluation de l'exposition aux pyréthrinoïdes en conditions contrôlées afin de mieux interpréter les données de biosurveillance en milieu professionnel. Dans un volet exploratoire, l'effet de cette exposition sur des changements métaboliques précoces a également évalué.**

Le présent projet se concentre donc principalement sur la relation entre l'exposition et les biomarqueurs.

Les objectifs spécifiques sont de :

- i) Caractériser la cinétique des biomarqueurs d'exposition à la perméthrine chez des volontaires exposés dans des conditions contrôlées, incluant le développement d'une nouvelle méthode analytique spécifique;
- ii) Comparer systématiquement la cinétique des biomarqueurs d'exposition à la perméthrine et cyperméthrine dans un même cadre expérimental contrôlé chez des volontaires exposés;
- iii) Documenter le profil temporel de biomarqueurs d'exposition à la cyperméthrine dans des conditions d'exposition réelles chez des travailleurs affectés à différentes tâches agricoles en intégrant les nouvelles notions de toxicocinétiques produites lors des expositions contrôlées.
- iv) Réaliser une étude exploratoire de l'effet de l'exposition aux pyréthrinoïdes chez les volontaires et travailleurs sur le profil métabolique urinaire, en utilisant une approche métabolomique pouvant servir à l'identification de biomarqueurs d'effets précoces.

### 1.8.3. Hypothèses de recherche

Hypothèse 1 : L'étude de la toxicocinétique de la perméthrine chez des volontaires permet de créer un profil d'absorption et d'élimination typique, observable dans des matrices humaines, permettant de quantifier ces paramètres.

Résultat attendu : Des données quantitatives humaines de demi-vie d'absorption et d'élimination, et de temps requis pour l'atteinte d'une concentration maximale dans l'urine et le sang et de pourcentage d'excrétion sous forme de métabolites urinaires,.

Hypothèse 2 : L'étude de la toxicocinétique de la cyperméthrine (groupe II) chez des volontaires en comparaison avec la perméthrine (groupe I) permet de créer un profil absorption et d'élimination typique des pyréthri-noïdes.

Résultat attendu : Des données quantitatives sont comparées pour la perméthrine et la cyperméthrine à des fins de comparaisons de similarité dans l'absorption et l'élimination.

Hypothèse 3 : Le suivi temporel des biomarqueurs d'exposition de pyréthri-noïdes chez des travailleurs permet d'observer la variabilité des profils toxicocinétiques et de raffiner les stratégies de biosurveillance.

Résultat attendu : Mesures de la variabilité inter et intra-individuelle, caractérisation de l'exposition professionnelle et des paramètres associés.

Hypothèse 4 : Des effets métabolomiques observables dans une matrice urinaire humaine sont associés à l'exposition à des faibles doses de pyréthri-noïde cyperméthrine et peuvent servir de biomarqueurs d'effet.

Résultat attendu : Mesures de changements dans le métabolome avant-après exposition et interprétation des changements biologiques.





## Chapitre 2

# MÉTHODE DE RECHERCHE

---



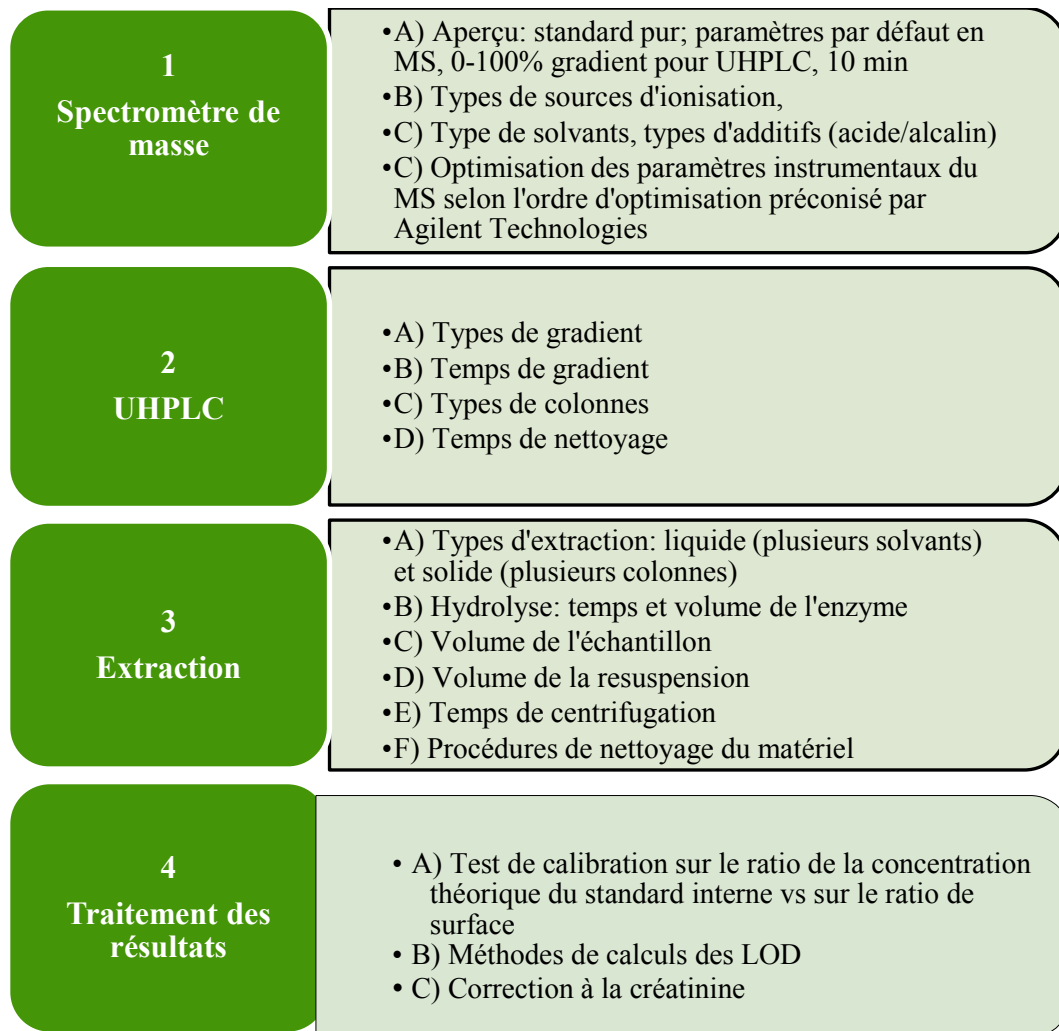


## 2. MÉTHODOLOGIE

### 2.1. Étude cinétique

#### 2.1.1. Méthode analytique en spectrométrie de masse pour la quantification des métabolites de pyréthrinoïdes

Plusieurs méthodes analytiques ont été développées pour identifier et quantifier les métabolites des pyréthrinoïdes. Les méthodes les plus courantes sont la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS) (Olson *et al.*, 2004) ou la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) (Leng et Gries, 2006b). Il n'y a toutefois à ce jour aucune méthode publiée utilisant la nouvelle technologie HPLC couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol (HPLC-Q/TOF). Les considérations techniques liées principalement à la disponibilité d'instruments justifient ce développement analytique et l'utilisation de cette méthode pour l'analyse de l'ensemble des échantillons de ce projet de thèse. Toutes les étapes présentées ici en ce qui concerne l'extraction, l'élution en UHPLC et la quantification par MS Q-ToF ont été optimisées (figure 1). La méthode finale est schématisée dans la figure 2. Elle se retrouve également dans les articles des chapitres 3, 4, 5.



**Figure 1 : Figure représentant les paramètres optimisés et l'ordre d'optimisation pour la méthode finale utilisée en biosurveillance**

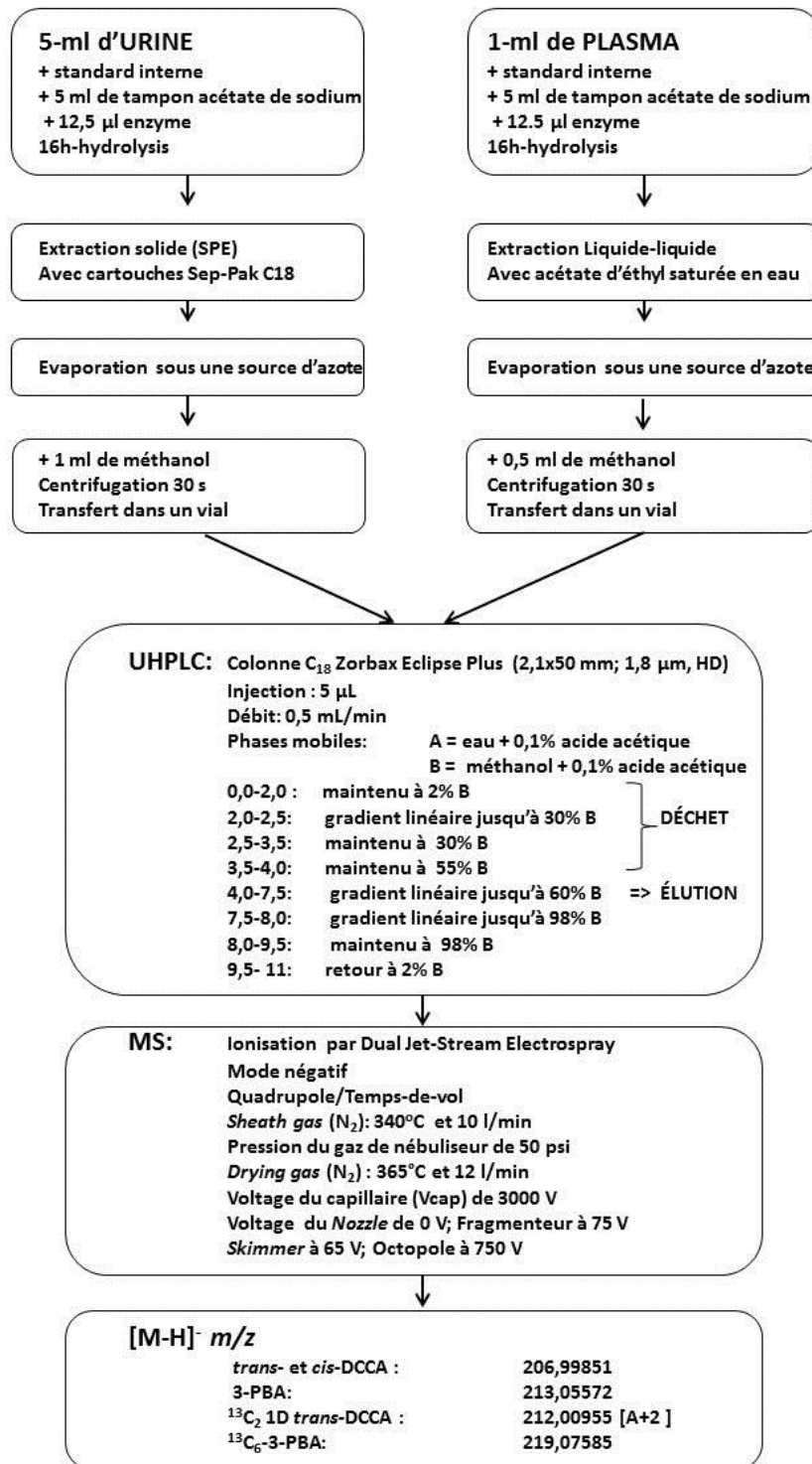


Figure 2 : Schéma de la méthode analytique finale utilisée pour l'analyse des biomarqueurs d'exposition 3-PBA et *cis* et *trans*-DCCA.

### 2.1.2. Validation de la méthode

Pour les volontaires, les limites de détection méthodologique dans l'urine (LOD) de *trans*-DCCA, *cis*-DCCA et 3-PBA était de 3,2, 9,0 et 0,6 µg/l (égale à trois écarts-types de ratio d'un blanc analysé 10 fois divisé par la pente de la courbe de calibration), tandis que les limites de détection méthodologique dans le plasma (LOD) de *trans*-DCCA, *cis*-DCCA et 3-PBA était de 3,2, 1,6 et 8,0 µg/l (tableau 1). La variation intra-lot de 10 analyses répétées d'échantillons d'urine et dans le plasma dans les mêmes conditions de calibration et de réglage (contrôles positifs) variait respectivement entre 4 et 13% et entre 7 et 29%. Comme chaque analyse cinétique d'un même travailleur est réalisée sur un même lot, la variation inter-lot n'avait qu'une portée restreinte sur les résultats.

**Tableau 1 : Limite de détection de la méthode utilisée pour la mesure de métabolites urinaires et plasmatiques chez des volontaires exposés oralement à 0,1 mg/kg pc de perméthrine ou de cyperméthrine, ainsi que les limites de détection de la méthode finale utilisée chez les travailleurs agricoles.**

	Volontaires		Travailleurs	
	Urine	Plasma	Urine	
3-PBA	0,6	8,0	0,1	
<i>Trans</i> -DCCA	3,2	3,2	0,1	
<i>Cis</i> -DCCA	9,0	1,6	0,3	

Pour les travailleurs, les limites de détection (LOD) de *trans*-DCCA, *cis*-DCCA et 3-PBA calculé [ $3 \sigma/m$  où  $\sigma$  = ratio de surface STD/STDI des  $n$  réanalyses de blancs et  $m$  = la plus petite pente des  $n$  analyses] offre des LOD de 0,1 à 0,3 µg/L. La variation intra-lot de 10 analyses répétées d'échantillons d'urine dans les mêmes conditions de calibration et de réglage (échantillons à blanc enrichi avec les standards de référence à deux niveaux ou des contrôles positifs) variait entre 2,8 et 3,2%, ce qui est excellent (tableau 2).

**Tableau 2 : Variabilité de la méthode utilisée pour la mesure de métabolites urinaires et plasmatiques chez des volontaires exposés oralement à 0,1 mg/kg pc de perméthrine ou de cyperméthrine, ainsi que les paramètres de validation de la méthode finale utilisée chez des travailleurs agricoles.**

Biomarqueurs	Variabilité intra-lot de la méthode (%)		
	Volontaires <sup>a</sup>		Travailleurs <sup>b</sup>
	Urine	Plasma	Urine
3-PBA	9	7	3
<i>Trans</i> -DCCA	4	9	3
<i>Cis</i> -DCCA	13	29	3

<sup>a</sup> Selon des contrôles positifs représentant mieux les concentrations élevées retrouvées chez les volontaires

<sup>b</sup> Selon la moyenne des enrichis avec un standard de 100 et 200 pmol/L

Des contrôles enrichis ayant une concentration connue ont été insérés dans chaque lot d'analyse pour s'assurer que les paramètres instrumentaux et que la courbe de calibration était valide. Si la variation était de plus de 15%, tous les échantillons de ce lot étaient ré-analysés. Il n'y a que seulement 15% de la variabilité intra et inter-individuelle pouvant s'expliquer par des considérations techniques. Aussi, tous les échantillons d'un même travailleur ou d'un même volontaire étaient analysés dans un même lot afin de contrer la variation inter-lot. Le coefficient de variation maximal attribuable à la méthode analytique était de 15%. De plus, un programme de fine maintenance quotidienne mesurant des masses de calibration instrumentale était réalisé pour obtenir un écart d'au maximum de 2 ppm sur la masse attendue.

### 2.1.3. Conception de l'étude cinétique des biomarqueurs chez des volontaires

#### Conception des outils

Formulaires de consentement, les formulaires d'inclusion, l'auto-questionnaire pour les participants durant l'étude et la demande au comité éthique ont été les premières étapes du projet.

## **Étude clinique**

L'étude de la cinétique des biomarqueurs chez des volontaires permet de raffiner des données toxicocinétiques. Des volontaires ont été exposés dans des conditions contrôlées à une dose orale unique soit de perméthrine, soit de cyperméthrine équivalente à la dose de référence orale (RfD). À défaut de pouvoir procéder à une injection intraveineuse pour des raisons éthiques ou la voie d'inhalation pour des questions de faisabilité expérimentale, la voie orale permet d'obtenir une bonne indication de la distribution et de l'élimination et ainsi de s'affranchir le plus possible de l'impact de la vitesse d'absorption, comme c'est le cas pour la voie cutanée. Un suivi médical strict a été établi selon un protocole préalablement soumis et approuvé par le Comité d'éthique de la recherche de l'Université de Montréal. Une ponction sanguine et une collecte d'urine a été réalisée quelques minutes avant l'administration. Des collectes urinaires ont ensuite été effectuées sur 72 heures après l'exposition et une infirmière a procédé à des prélèvements sanguins immédiatement après l'exposition puis à une fréquence décroissante sur la même période que les urines. La perméthrine et la cyperméthrine de même que leurs métabolites terminaux, l'acide *cis-* et *trans*-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-diméthyl cyclopropane (*cis-* et *trans*-DCCA) et l'acide 3-phénoxybenzoïque (3-PBA) ont été mesurés dans le sang et les urines de chacun des volontaires.

### **2.1.4. Participants à l'étude clinique**

Les participants ont été recrutés sur une base volontaire parmi les étudiants de l'Université de Montréal et de leur famille et les amis. Les volontaires étaient jeunes, non-fumeurs, en bonne santé, d'origine caucasienne et ne prenaient pas de médicament. Trois hommes âgés de 24 à 37 ans ont été recrutés et trois femmes âgées entre 31 et 36 ans. Cinq des six mêmes sujets ont été exposés à la cyperméthrine et la perméthrine, avec une période de trois semaines entre les doses. Ils n'avaient pas été exposés aux pyréthrinoïdes dans les trois mois précédant le

protocole de dosage expérimental, sauf peut-être par leur régime alimentaire. Pendant la période d'étude et les deux jours avant chaque dosage, on leur a demandé de ne pas manger de fruits et légumes afin de limiter l'ingestion d'aliments contaminés, car il est connu que le régime alimentaire est généralement la principale voie d'absorption de pesticides dans la population générale (Schettgen *et al.*, 2002a). Ils ont également été priés d'éviter la consommation d'alcool et de drogues au cours de cette période, ce qui peut affecter le métabolisme de certains composés chimiques en interférant avec l'activité enzymatique (Choi *et al.*, 2002; Gueguen *et al.*, 2006).

### 2.1.5. Échantillonnage et dosage

Les volontaires ont été exposés de façon aiguë à 0,1 mg/kg de poids corporel (pc) soit de cyperméthrine (*trans/cis*: 58:42) ou de perméthrine (*trans/cis*: 60:40) (pureté > 94%; EQ laboratory, Atlanta, GA) par voie orale (correspondant à 7 mg pour un individu de 70 kg). Selon l'évaluation récente faite par le U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA), cette dose est considérée sans effet néfaste pour un scénario d'exposition aiguë dans la population générale incluant les enfants (U.S. EPA 2006 ; 2009), la dose de référence orale respective pour une exposition à court terme étant établie à 0,25 et 0,1 mg/kg pc. Pour chacun des deux produits étudiés, six volontaires adultes en bonne santé ont ainsi été exposés. Une période de trois semaines entre chaque série d'expositions a été établie afin de s'assurer de l'élimination complète du produit de l'organisme entre les deux administrations. Pour l'administration, le produit a été dissout dans de l'huile d'olive biologique (10 mg de produit/ml d'huile). Après l'administration, les bénévoles ont reçu 60 ml d'eau. L'embout utilisé pour le dosage a ensuite été rincé avec de l'huile pure et administré aux participants, avec encore 60 ml d'eau.

Afin de documenter la cinétique du produit-mère et des métabolites dans le sang, des prélèvements sanguins sériés de 40 ml (4 tubes x 10 ml) ont été effectués par ponctions veineuses sur le bras avant l'exposition ( $t = 0$ , soit 30 minutes avant l'administration du pesticide) et à des heures fixes sur une période de 72 h après l'exposition, c'est-à-dire 0,5, 1, 1,5, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 48, et 72 h après l'administration ( $n = 12$  prélèvements par individu).

Dans le but de faciliter les prélèvements sanguins, un cathéter a été posé durant toute la journée suivant l'exposition.

Afin de documenter la cinétique urinaire des métabolites, des urines complètes ont aussi été recueillies à l'intérieur de contenants distincts et clairement identifiés (pesticide, individu, heure) à des périodes fixes, à savoir aux temps -3 – 0 h avant exposition et 0 – 3, 3 – 6, 6 – 9, 9 – 12, 12 – 24, 24 – 36, 36 – 48, 48 – 60, 60 – 72, 72 – 84 h post-administration (n = 11 collectes par individu et toute miction à l'intérieur d'une période établie a été combinée au même contenant). Toutes les mictions ont été recueillies dans des bouteilles en polypropylène Nalgene® de 1 à 1,5 l déjà identifiée. Une fois collectés, les échantillons d'urine ont été conservés dans le réfrigérateur avant la mesure du volume total d'urine. Chaque collection d'urine a ensuite été aliquotée dans 5 tubes étiquetés de 15 ml et un contenant de 120 ml avant l'entreposage à -20 °C jusqu'à l'analyse. Les spécimens ont été codés pour respecter l'anonymat des participants où on y retrouve également la date et l'heure de l'échantillonnage.

Immédiatement après la collecte, les échantillons de sang ont été centrifugés pour précipiter les globules rouges et isoler le plasma. Des échantillons de plasma ont ensuite été répartis en aliquots de 2 ml étiquetés et entreposés à -20 °C jusqu'à l'analyse.

Les volontaires ont passé le premier 12 h suivant l'administration de la dose dans un local au département de Santé environnementale et santé du travail de l'Université de Montréal, Canada. Sur la période d'échantillonnage de quatre jours, les participants ont visité le département quotidiennement pour leur prélèvement de sang du matin et sont venus porter leur collection d'urine. Au cours de la période d'étude, les volontaires ont en outre été invités à remplir un questionnaire afin de documenter des informations personnelles (poids, taille), les habitudes de vie (c.-à-activités physiques, l'exposition à la fumée secondaire ou de fumeur occasionnel) ainsi que la consommation de drogues, alcool, fruits, légumes et céréales au cours des deux jours avant chaque dosage, et les symptômes reliés potentiellement aux pesticides. Des repas préparés avec des ingrédients certifiés biologiques ont été fournis pendant toute la semaine de l'étude.



### 2.1.6. Produits commerciaux utilisés

Des standards de référence de *cis*-DCCA, *trans*-DCCA et 3-PBA et des standards internes marqués de  $^{13}\text{C}_2$   $^1\text{D}$  *trans*-DCCA et  $^{13}\text{C}_6$ -3-PBA (>99% pureté) ont été achetés chez Cambridge Isotope Laboratories Inc. (Andover, MA, USA). De l'acétonitrile et du méthanol de niveau LC-MS *optima*, de l'acide acétique de niveau HPLC et de l'acétate d'éthyle ont été obtenus chez Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada). Les composés utilisés pour l'administration orale des volontaires ont été achetés chez EQ laboratories (40 *cis*: 60 *trans* pour la perméthrine et 42:58 pour la cyperméthrine; pureté >94%) (Atlanta, GA, USA). L'enzyme  $\beta$ -Glucuronidase/arylsulfatase (100000 Fishman U ml<sup>-1</sup> and 800000 Roy U ml<sup>-1</sup> from Helix pomatia) a été obtenue de Roche Diagnostics (Laval, Québec, Canada).

### 2.1.7. Traitement des échantillons

Un aliquot de 1 ml de plasma de participant a été mélangé avec 100  $\mu\text{l}$  de mélange de standard interne de  $^{13}\text{C}_2$   $^1\text{D}$  *trans*-DCCA et  $^{13}\text{C}_6$ -3-PBA à une concentration de 1 nmol/ml. Un tampon à l'acétate (0,1 M) de 0,1 ml à un pH de 5 a été ajouté et les échantillons ont été incubés pendant 16h avec 12,5  $\mu\text{l}$  de  $\beta$ -glucuronidase/ arylsulfatase à 37 °C dans un bain agitant pour obtenir la somme des métabolites libres et conjugués. Ceci a été suivi par une extraction liquide-liquide, à deux reprises, avec 4,5 ml d'acétate d'éthyle saturé en eau (agitation pendant 20 minutes et centrifugation à 3400 rpm pendant 10 min à 10 °C). La couche organique supérieure de chaque extraction a été combinée dans un tube en verre de 10 ml et le solvant a été évaporé à sec sous un courant d'azote dans un bain à 35°C. Les résidus ont été remis en suspension dans 500  $\mu\text{l}$  de méthanol, centrifugés 30 secondes à 3400 rpm et transférés dans des flacons pour analyse.

Un aliquot de 1 ml d'urine de personnes exposées a été mélangé avec 100 pmol de mélange de standard interne de  $^{13}\text{C}_2$   $^1\text{D}$  *trans*-DCCA et  $^{13}\text{C}_6$ -3-PBA à une concentration de 1 nmol/ml. Le pH a été ajusté à 5 par l'addition de 1 ml de tampon acétate (0,1 M) et une hydrolyse enzymatique a été réalisée avec 12,5  $\mu\text{l}$  de  $\beta$ -glucuronidase /arylsulfatase pendant 16 h à 37 °C. Les analytes ont ensuite été extraits en utilisant des cartouches Sep-Pak C18 (Waters,

Milford, MA, USA). Les cartouches ont été d'abord conditionnées avec 4 ml de méthanol, suivi par 8 ml d'eau. Les urines ont été passées à travers la colonne et mises au rebut. Les cartouches ont été lavées avec 8 ml d'eau. Les analytes ont été ensuite élués de la colonne avec 8 ml de méthanol, dans des tubes en verre de 10 ml. Le solvant a été évaporé à sec sous un courant d'azote dans un bain à 35 ° C. Les résidus ont été remis en suspension dans 500 µl de méthanol, centrifugés 30 secondes à 3400 rpm et transférés dans des flacons pour analyse.

### 2.1.8. Analyse des échantillons

L'analyse de *cis*-DCCA, *trans*-DCCA et 3-PBA a été effectuée en utilisant un système Agilent modèle 1290-LC gradient binaire UHPLC (Agilent, Mississauga, Canada) relié à un modèle Agilent 1290- échantillonneur automatique et un compartiment de colonne thermostatée (Agilent, Mississauga, Canada), et couplé à un spectromètre de masse Modèle 6530 quadripôle à temps de vol (Agilent, Mississauga, Canada) avec une source d'ionisation par électro-spray (AJS ESI). L'ionisation a été réalisée en mode négatif et tous les paramètres spécifiques ESI-MS ont été optimisés manuellement. Les composés ont été séparés en utilisant une colonne C18 Zorbax Eclipse Plus (2,1 x 50 mm; 1,8 µm, HD) d'Agilent (Mississauga, Canada). La température de la colonne a été maintenue à 35 °C. La phase mobile consistait en un éluant A composé d'eau et d'acide acétique à 0,1% et un éluant B composé de méthanol et d'acide acétique à 0,1%. L'élution a été effectuée en 11 min en utilisant un gradient, à un débit de 0,5 ml/min. Le programme suivant a été utilisé: i) 2% B pour 2 min, ii) gradient linéaire à 30% de B de 2 à 2,5 min, iii) maintien à 30% B de 2,5 à 3,5 min, iv) augmentation jusqu'à 55% B de 3,5 à 4 min et v) jusqu'à 60% B de 4 à 7,5 min, vi) gradient linéaire jusqu'à 98% B de 7,5 à 8 min, vii) maintien à 98% B de 8 à 9,5 min, et viii) retour aux conditions initiales de 2% B pour 1,5 min. Le solvant a été envoyé aux déchets avant 4 min et ensuite dirigé vers le MS pour empêcher la suppression d'ions par les sels contenus dans les matrices. Tous les composés d'analyse ont été élués entre 6,2 et 7,2 min. Les échantillons ont été conservés à 5 °C sur le plateau d'injection et 5 µl ont été injectés. Les masses exactes des analytes ayant un signal optimal ont été déterminées sous les conditions ToF suivantes (non traduites, tels que retrouvées sur l'instrument): *sheath gas* (N<sub>2</sub>) ayant une température de 340°C et *sheath gas*

*flow rate* de 10 l/min; la pression du *nebulizer gas* de 50 psi; la température du *drying gas* (N<sub>2</sub>) de 365°C et le *drying gas flow rate* de 10 l/min; le voltage du *capillaire* (V<sub>cap</sub>) de 3000 V, *nozzle voltage* de 0 V, fragmenteur à 75 V, *skimmer* à 65 V et *octopole* à 750 V. Les ions précurseurs [M-H]<sup>+</sup> analysés furent *m/z* 206,99851 pour le *trans-* et *cis*-DCCA, *m/z* 213,05572 pour le 3-PBA, *m/z* 212,00955 pour le <sup>13</sup>C<sub>2</sub> 1D *trans*-DCCA et 219,07585 pour le <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-3-PBA. La masse de l'isotope A+2 du chlore a été utilisée pour le <sup>13</sup>C<sub>2</sub> 1D *trans*-DCCA afin d'éviter les interférences avec la masse isotopique du standard non marqué. L'identification et la quantification ont été réalisées par le mode *Extracted Ion Chromatogram* (EIC).

La quantification a été obtenue à partir des courbes d'étalonnage standard dans l'urine ou dans le plasma. Ces courbes ont été établies selon une échelle de 15 à 1000 pmol/ml en fonction de l'analyte. Les signaux de réponse correspondent aux ratios du signal de chaque ion d'analyte sur le standard interne.

### 2.1.9. Analyse de la créatinine

La créatinine a été mesurée dans l'urine par déprotonisation avec de l'acide picrique alcaline, nommée méthode de Jaffé avec déprotonisation. Suivie d'une mesure par spectrophotomètre (Boehringer Mannheim, Allemagne).

### 2.1.10. Analyse toxicocinétique

Pour déterminer les paramètres toxicocinétiques sur la base des échantillons plasmatiques ou des profils urinaires de métabolites après une exposition orale, nous avons supposé un équilibre dynamique entre les tissus et les niveaux sanguins (sang et les niveaux dans les tissus évoluant en parallèle) et donc que le corps pourrait être représenté en utilisant un modèle à un seul compartiment avec une élimination de premier ordre (Renwick, 2008; Tornero-Velez *et al.*, 2012).

$C(t) = Ae^{-k_{abs} \cdot t} + B_{elim} \cdot t$  où  $C(t)$  est la concentration sanguine en fonction du temps (ou du taux d'excrétion urinaire),  $A$  et  $B$  sont les coefficients et  $k_{abs}$  préexponentiel et  $k_{elim}$  sont les coefficients pour les phases d'absorption et d'élimination, respectivement. Le temps nécessaires à l'atteinte de la concentration maximale ( $T_{max}$ ) ainsi que les demi-vies apparentes d'absorption ( $\ln 2/k_{abs}$ ) et d'élimination ( $\ln 2/k_{elim}$ ) ont également été déterminées.

De la concentration plasmatique ( $C$ ) - profils temporels, nous avons calculé l'aire sous la courbe (AUC), l'aire sous la première minute de la courbe (AUMC), le temps de séjour moyen (MRT), la clairance plasmatique (CL), le volume apparent de distribution (Vd). Équations utilisées pour calculer ces paramètres sont:

$$AUC = \frac{1}{2} \sum_{\forall i} (t_i - t_{i+1}) [C(t_i) + C(t_{i+1})]$$

$$AUMC = \frac{1}{2} \sum_{\forall i} (t_i - t_{i+1}) [t_i C(t_i) + t_{i+1} C(t_{i+1})]$$

$$MRT = \frac{AUMC}{AUC}$$

$$CL = \frac{\text{Dose absorbée (fraction de la dose administrée)}}{AUC}$$

$$Vd = \frac{CL}{k_{elim}}$$

### 2.1.11. Considérations éthiques

L'étude repose sur une participation volontaire des individus. Les sujets désirant participer à l'étude devront signer un formulaire de consentement libre et éclairé, après avoir reçu toute l'information nécessaire concernant le projet. Chaque participant était libre de se retirer à tout moment s'il le désirait, sans aucun préjudice. Le protocole d'étude, le formulaire de consentement, ainsi que les autres documents pertinents ont été présentés pour approbation au Comité d'éthique de la recherche de l'Université de Montréal (certificat 12033-CERES-D). De plus, les doses d'expositions proposées ont été sélectionnées de façon à être sécuritaires et à ne pas induire d'effets néfastes chez les volontaires selon les données actuellement disponibles. Les signes et symptômes cliniques ont été suivis par du personnel médical certifié durant

toutes les expériences. L'anonymat des sujets a aussi été respecté par une codification des échantillons. Chaque participant a reçu une compensation monétaire pour son temps et les inconvénients associés à l'étude.

## 2.2. Étude de terrain chez des travailleurs

Une étude a été réalisée en milieu de travail chez des personnes suivant un épisode d'exposition à chacun de ces pyréthriinoïdes. Outre la caractérisation du milieu, cette partie complémentaire permet de vérifier l'applicabilité des modèles pour reconstituer les doses journalières absorbées de ces pyréthriinoïdes à partir de profil temporel de biomarqueurs dans des matrices biologiques accessibles, telles que l'urine.

### 2.2.1. Conception de l'étude

Ainsi, des travailleurs agricoles exposés à la perméthrine ou à la cyperméthrine ont été recrutés afin d'établir le profil temporel des métabolites *cis*- et *trans*-DCCA et PBA dans leurs urines. Les travailleurs visés *a priori* sont en particulier ceux de la production maraîchère, où les pyréthriinoïdes sont largement utilisés. Puisque les pyréthriinoïdes sont aussi abondamment utilisés comme insecticides sur les animaux, les éleveurs ont également été ciblés mais sans succès de recrutement. L'échantillonnage a donc inclus des individus affectés à différentes tâches, c'est-à-dire effectuant des activités de préparation et d'application de cyperméthrine ou des travaux subséquents dans des zones traitées avec ces pesticides pour les travailleurs en cultures maraichères (carottes, laitues). Un protocole similaire à celui utilisé par notre équipe dans une étude sur les fongicides et insecticides organophosphorés chez des travailleurs en arboriculture a été utilisé (Berthet *et al.*, 2012). Tous les travailleurs ont été exposés lors de conditions professionnelles normales.

### 2.2.2. Participants de l'étude en milieu de travail

Pour le recrutement des participants, une stratégie similaire à celle utilisée pour un projet sur le bruit et l'exposition aux organophosphorés a été suivie et a ciblé les travailleurs de la Montégérie. Avec l'aide des membres du comité de liaison CSST-UPA des producteurs agricoles du Québec ont pu être sollicité pour participer à cette étude sur les pyréthriinoïdes. Les employeurs des entreprises agricoles de la Montégérie utilisant la perméthrine et la

cyperméthrine ou exposés dans leur milieu de travail et intéressés à participer à notre étude ont été rencontré par un membre de notre équipe pour discuter du projet. Ensuite, les travailleurs ont pu être rencontrés.

Les travailleurs recrutés ont été invités à effectuer une collecte urinaire (première urine complète du matin) avant un épisode d'exposition professionnelle à la perméthrine ou cyperméthrine afin d'établir le niveau de base d'exposition. L'urine a été recueillie dans un seul contenant. Dans un deuxième temps, toutes les mictions durant une période d'application de pesticides ou encore de manipulation dans une zone traitée ont été collectées ainsi que toutes les urines durant les 3 à 4 jours suivant cette période d'exposition (selon la faisabilité). Chaque urine de la journée a été recueillie dans un contenant différent et clairement identifiée (date, heure, individu). Chaque travailleur a dû remplir une feuille de temps de collecte sur laquelle il a indiqué la date et l'heure de la miction pour chaque contenant correspondant qui aura été préalablement identifié par un numéro. Les contenants seront ensuite ramassés directement sur la place de travail.

Puisque ce protocole implique des mesures répétées chez les travailleurs et donc la possibilité de 10 à 20 échantillons par individu, il a été planifié de recruter une quarantaine de travailleurs des deux milieux ciblés *a priori* (horticulture maraîchère et élevage) et affectés à différentes tâches. Toutefois, après des communications répétées avec des travailleurs dans le milieu de l'élevage, il s'est avéré que ce milieu n'utilisait que très peu ces pesticides. Un total de 34 travailleurs exposés potentiellement à la cyperméthrine (Ripcord 400) dans le milieu de cultures maraichères ont été recrutés. Les travailleurs de différentes origines ethniques ont été inclus et il n'y avait pas de critères d'inclusion spécifiques en ce qui concerne le statut de fumeur, l'âge, le sexe, le statut socio-économique ou l'état de santé.

### **2.2.3. Considérations éthiques**

Les mêmes considérations éthiques que celles présentées pour l'étude chez les volontaires ont été respectées. Le comité d'éthique de recherche en santé de l'Université de Montréal a approuvé le protocole, le questionnaire et les formulaires de consentement (certificat-12033

CERES-D). Tous les travailleurs ont été recrutés sur une base volontaire et ont donné leur consentement éclairé à participer à l'étude. Ils ont également été informés de leur droit de se retirer de l'étude en tout temps. Les volontaires ont reçu une petite compensation monétaire pour leur temps et les désagréments causés.

#### **2.2.4. Échantillonnage urinaire chez les travailleurs**

La collecte d'échantillons d'urine sériés a été menée suivant deux types d'exposition différents, à savoir l'épandage du pesticide (y compris la préparation, le mélange et la pulvérisation) et le désherbage/activités de récolte après le délai de rentrée requis. L'échantillonnage a été effectué au cours de la période de la saison présumée être associée aux pires scénarios d'exposition. Les personnes recrutées ont été invitées à fournir : i) une urine complète pré-saison lors du premier matin, afin d'établir les niveaux de référence d'exposition ainsi que ii) toutes les urines complètes avant et pendant une période typique de trois jours suite à une exposition à une formulation à base de cyperméthrine. Chaque miction a été recueillie dans une bouteille séparée Nalgene® de polypropylène de 1L contenant du thymol pour réduire la croissance bactérienne. Les échantillons ont été conservés dans des glacières ou dans un réfrigérateur sur place et ont été transportés à l'intérieur de quelques heures par notre équipe au laboratoire de l'Université de Montréal. Une fois dans le laboratoire, le volume d'urine a été mesuré et des aliquots (trois tubes de 15 ml et deux contenants de 120 ml) ont été congelés à -20 °C jusqu'à l'analyse.

#### **2.2.5. Produits commerciaux utilisés**

Mêmes fournisseurs que pour l'étude clinique.

#### **2.2.6. Traitement des échantillons**

Les aliquots de 5 ml d'urine de travailleur ont été mélangés avec 100 µl de mélange de standard interne de  $^{13}\text{C}_2$   $^1\text{D}$  *trans*-DCCA et  $^{13}\text{C}_6$ -3-PBA à une concentration de 1 nmol/ml. Un tampon 5 ml d'acétate (0,1 M) a été ajouté et les échantillons d'urine ont été soumis à une



hydrolyse enzymatique de 16h pendant une nuit avec 12,5 µl de β-glucuronidase/arylsulfatase à 37 °C avant une extraction en phase solide (SPE) utilisant des cartouches Sep-Pak C18 (Waters, Milford, MA, USA). Les cartouches ont été d'abord conditionnées avec 4 ml de méthanol, suivi par 8 ml d'eau. Les urines ont été passées à travers la colonne et mises au rebut. Les cartouches ont été lavées avec 8 ml d'eau. Les analytes ont été ensuite élués de la colonne avec 8 ml de méthanol dans 10 ml de tubes de verre. Le solvant a été évaporé à sec sous un léger courant d'azote à 35 °C. Les culots ont été remis en suspension dans 1 ml de méthanol, centrifugés pendant 30 secondes à 3400 rpm et transférés dans des flacons pour analyse. Les métabolites ont été analysés par chromatographie liquide ultra-haute performance couplée à un spectromètre de masse quadripôle/temps de vol (UHPLC-Q/ToF).

### 2.2.7. Analyse des échantillons

L'instrument utilisé UHPLC-MS fut le même que lors de l'étude clinique, ainsi que les conditions d'éluion. Les paramètres du spectromètre de masse ont toutefois été ré-optimisés manuellement en raison des basses concentrations d'analytes retrouvées pour des niveaux d'exposition environnementale. Les signaux des analytes ont été acquis sous ces conditions: (non traduites, tels que retrouvées sur l'instrument): *sheath gas* (N<sub>2</sub>) ayant une température de 340 °C et *sheath gas flow rate* de 10 l/min; la pression du *nebulizer gas* de 50 psi; la température du *drying gas* (N<sub>2</sub>) de 365°C et le *drying gas flow rate* de 12 l/min; le voltage du *capillaire* (V<sub>cap</sub>) de 3000 V, *nozzle voltage* de 0 V, fragmenteur à 75 V, *skimmer* à 65 V et *octopole* à 750 V. Les masses m/z analysées sont les mêmes que pour l'étude clinique.

La quantification a été obtenue à partir des courbes d'étalonnage de standards dans l'urine ou dans le plasma. Ces courbes ont été établies selon une échelle de 7 à 500 pmol/ml en fonction de l'analyte. Les points de calibration étaient de 0, 25, 50, 100, 200, 350 and 500 pmol/ml d'extraits méthanoliques pour le *trans*-DCCA et 3-PBA et 0, 7, 14, 29, 57, 100, 143 pmol/ml pour le *cis*-DCCA. La concentration de standard interne qui a été choisie était de 200 pmol/ml d'extraits méthanoliques. La stabilité des extraits méthanoliques conservés à -20 °C fut estimée à un mois et la stabilité dans l'urine conservés à -20 °C fut estimée à plus de 3 mois.

### 2.2.8. Créatinine

Même méthode que pour l'étude clinique.

### 2.2.9. Questionnaire

Les travailleurs ont dû remplir un auto-questionnaire rédigé dans leur langue maternelle (français ou espagnol). Le questionnaire a été rempli avant la saison ainsi que quotidiennement durant la période de collecte de trois jours suivant l'exposition aux pesticides pyréthrinoïdes. Les renseignements personnels ont été recueillis (sexe, l'âge, l'origine ethnique, le plus haut niveau d'éducation, l'état de santé général) ainsi que des informations sur les habitudes de vie (activité physique, l'usage domestique de pesticides contenant des produits à partir d'une liste pré-établie, tabagisme ou l'exposition à la fumée secondaire, la consommation d'alcool, de médicaments, consommation d'aliments qui peuvent contenir des résidus de pesticides). Des questions liées au travail ont aussi été incluses (les heures de travail, le temps passé dans une zone traitée ou la préparation/le mélange/période de pulvérisation, la décontamination du matériel, les pesticides utilisés sur le terrain au cours de la période de l'étude, le moyen d'application de produits, la manipulation de plantes ou de fruits ou légumes traités, le contact avec des animaux traités, la formulation utilisée), le port d'équipement de protection individuelle (tyvec, port ou non de gants, de masques...) et l'hygiène personnelle après le travail (douche, lavage, changement/manutention des vêtements de travail). Ces renseignements permettent de documenter les facteurs pouvant augmenter les risques ou influencer les résultats, tout en leur demandant de ne pas changer leurs habitudes lors de la réalisation de l'étude.

### 2.2.10. Analyse des profils temporels de biomarqueurs d'exposition chez les travailleurs

Les profils temporels de *trans*-DCCA, *cis*-DCCA et 3-PBA ont été évalués dans l'urine des travailleurs et exprimés soit en concentrations, soit en taux d'excrétion par unité de temps. Sur la base des mesures répétées, la variabilité intra-individuelle a été observée. La variabilité

inter-individuelle a également été évaluée. Un modèle linéaire mixte (MIXM) a été utilisé pour évaluer si des mesures répétées ont eu une influence statistique sur les concentrations ou les taux de biomarqueurs excrétion urinaire tout en tenant compte de l'effet de divers facteurs inter-individuels documentés par questionnaire. Le modèle mixte est un modèle simple d'utilisation et répondant bien à la conception de ce volet (Brady et West, 2009; Hines *et al.*, 2003; Peugh et Enders, 2005; Shekm et Ma, 2011; SPSS, 2002).

## 2.3. Contributions de l'étudiante

### Articles 1 et 2:

En lien étroit avec sa directrice, l'étudiante Mylène Ratelle, a travaillé au premier plan sur les aspects suivants :

- Rédaction des documents et des outils nécessaires à l'étude clinique : déroulement de l'étude, auto-questionnaire, formulaire d'inclusion/consentement
- Demande et suivi au Comité éthique de la recherche
- Développement de la méthode analytique et validation
- Recrutement de personnel médical
- Supervision du déroulement de l'étude clinique
- Traitement et analyse des échantillons biologiques en spectrométrie de masse
- Analyse des concentrations urinaires de créatinine
- Traitement et analyse des données

Mylène Ratelle et Michèle Bouchard ont co-rédigé les articles 1 et 2, Mylène Ratelle ayant travaillé sur le premier jet. Jonathan Côté a contribué au calcul des paramètres cinétiques et à la révision de l'article.

### Article 3 :

En lien étroit avec sa directrice, l'étudiante Mylène Ratelle, a travaillé au premier plan sur les aspects suivants :

- Rédaction des documents et des outils nécessaires à l'étude clinique : déroulement de l'étude, auto-questionnaire, formulaire d'inclusion/consentement
- Demande et suivi au Comité éthique de la recherche
- Raffinement de la méthode analytique en MS et validation

- Recrutement de travailleurs
- Déroulement du volet terrain à l'été 2012
- Analyse des concentrations urinaires de créatinine
- Statistiques : après consultation avec des statisticiens
- Analyses des données

Mylène Ratelle et Michèle Bouchard ont co-rédigé l'article 3, Mylène Ratelle ayant travaillé sur le premier jet. Jonathan Côté a contribué à la révision de l'article. Jérôme Lavoué a fourni une assistance pour tout l'aspect des analyses statistiques à l'aide des modèles multivariés. Les analyses en spectrométries de masse ont été réalisées par les techniciens Ross Thuot et Marc Mantha.

#### **Article 4 :**

Mylène Ratelle a effectué les aspects suivants du projet en collaboration étroite avec Pr Ching Yu Lin, de l'Université Nationale de Taiwan, avec laquelle elle a initié la collaboration et:

- Protocole du volet métabolomique de la recherche
- Analyse des échantillons en NMR
- Traitement des données

Rédaction de l'article en collaboration étroite avec Pr Ching Yu Lin. Michèle Bouchard a effectué une révision de l'article et contribué à l'interprétation des résultats observés.



# LES ARTICLES

---





## Chapitre 3

### Article 1: Toxicokinetics of permethrin biomarkers of exposure in orally exposed volunteers

---

Ratelle, M., Côté, J., Bouchard, M. (2015). Toxicokinetics of permethrin biomarkers of exposure in orally exposed volunteers. *Toxicology Letter*, (2):369-375.

# Toxicokinetics of permethrin biomarkers of exposure in orally exposed volunteers

## Abstract

Permethrin is a widely used pyrethroid insecticide for which the toxicokinetics of exposure biomarkers in humans is not fully documented. The time courses of key biomarkers of permethrin exposure were thus assessed in accessible biological matrices of orally exposed volunteers. Six volunteers ingested 0.1 mg/kg body weight of permethrin (60:40 *trans/cis*). Blood samples were withdrawn at fixed periods over 72 h following ingestion and complete timed-urine voids were collected over 84 h post-dosing. *Cis*- and *trans*-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethyl-cyclopropane-1-carboxylic acids (*cis*- and *trans*-DCCA) and 3-phenoxybenzoic acid (3-PBA) were quantified in samples. In plasma, peak concentrations of *cis*-DCCA, *trans*-DCCA and 3-PBA were reached about  $\approx 7$  h post-dosing, and elimination appeared monophasic with a mean apparent elimination half-life ( $t_{1/2}$ ) of 6.2, 7.1 and 6.5 h, respectively. In urine, elimination rate time courses of *cis*-DCCA, *trans*-DCCA and 3-PBA evolved in parallel with plasma, with respective mean apparent elimination  $t_{1/2}$  of 4.5, 5.4 and 5.7 h. Over the 84-h period post-treatment, 43-46% of administered molar dose were excreted in urine as *trans*-DCCA (molar % of *trans*-permethrin) and 3-PBA. Results show similarities in the different metabolite profiles and a rapid equilibrium between urine and plasma levels; data should help interpret the significance of biological measurements and optimal sampling strategies.

## Keywords

Exposure biomarkers; permethrin; pyrethroids; DCCA; 3-PBA; oral exposure.

# 1. Introduction

Pyrethroid insecticides are an occupational as well as a general population concern, as they are widely used in agriculture and at home. They are among the chemical contaminants assessed in the large biomonitoring surveys in the general population in Canada and the U.S., the Canadian Health Measures Survey (CHMS) and the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) (CDC 2009; CHMS 2013).

Pyrethroids have molecular structures similar to those of pyrethrin compounds naturally present in some flowers. Halogenated groups were added to favor their environmental stability, while increasing toxicity compared to natural pyrethrins (Casida, 1980). Pyrethroids can exhibit toxic effects on the central and peripheral nervous systems, in part by prolonging the opening of voltage-dependent sodium channels (Choi and Soderlund, 2006; Soderlund et al., 2002). Although considered much more toxic to insects than humans, recent studies have shown that they are associated with immune and endocrine disruption effects in humans (Dilek and Muranli, 2013; Emara and Draz, 2007; Hadnagy *et al.*, 2003; Meeker *et al.*, 2009). To date, the U.S. EPA has not provided any reference concentration (RfC) to prevent non-carcinogenic effects from chronic inhalation exposure or lifetime cancer risk-specific dose. However, reference doses to prevent adverse effects from ingestion were derived for some pyrethroids on the basis of animal studies (*e.g.*, acute and chronic RfD of 0.25 mg/kg/day for permethrin based on a acute neurotoxicity study in rats to which an uncertainty factor of 100 was applied) (U.S. EPA, 2009).

Pyrethroids are absorbed mainly by the respiratory tract (as aerosols mainly) and dermal contact in workers, and by ingestion in the general population (INRS, 2010). They are metabolized primarily in the liver through a breakage of their ester bond (Scollon *et al.*, 2009). This is catalyzed either by esterases, mostly human carboxylesterase 1 and 2 (hCE1 and 2), or by oxidation by cytochrome P450 (CYP), in particular human CYP 2C8, the CYP 2C9, CYP 2C19 and CYP 3A4 (Crow *et al.*, 2007; Scollon *et al.*, 2009). Metabolites generated from the breakage are conjugated (to glucuronides mainly, sulfates and glycine) and excreted

mainly in urine within a few days (Eadsforth *et al.*, 1983; 1988; Kaneko and Miyamoto, 2001; Kühn *et al.*, 1999; Leng *et al.*, 2006a; Tomalik-Scharte *et al.*, 2005; Woollen *et al.*, 1992).

In the specific case of permethrin, one of the most commonly used pyrethroids (INSPQ, 2012), it has been shown that more than 60% of an oral dose of permethrin in rats were excreted in urine as metabolites (Anadon *et al.*, 1991). The measurement of major 3-phenoxybenzoic acid (3-PBA) and *cis-/trans*-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane-1-carboxylic acid (*cis*- and *trans*-DCCA) metabolites in urine has been proposed and is used for the biomonitoring of exposure in occupationally and environmentally exposed individuals (CDC 2009; CHMS 2013; Choi *et al.*, 2002; Kühn *et al.*, 1999; Leng *et al.*, 2006; Vermeulen *et al.*, 2002; Kühn). There is however limited data on the toxicokinetics of these biomarkers in humans; this is necessary to help interpret biomonitoring data and establish most appropriate sampling strategies, especially considering that spot samples are mostly collected for routine monitoring. The time course of DCCA (the sum of *cis*- and *trans*-DCCA) has been established in volunteers and patients dermally exposed to permethrin-based cream or solution and showed a complete elimination within 1 week post-treatment (Tomalik-Scharte *et al.*, 2005), but oral kinetic data of permethrin in humans are lacking. Nonetheless, these *cis-/trans*-DCCA and 3-PBA metabolites are common to cypermethrin, and an elimination half-life in urine between 6 to 16.5 h was estimated in volunteers orally exposed (Woollen *et al.*, 1992).

Most of the kinetic data on pyrethroids are based on animal studies. There are known inter-species differences in the liver metabolism rate of pyrethroids (Scollon *et al.*, 2009). The intrinsic clearance rate of pyrethroids in rats was reported to be 5- to 10-fold greater than that of human microsomes, with the exception of *trans*-permethrin which was 45% higher in humans (Scollon *et al.*, 2009). Studies in rats have also shown the importance of documenting specifically the kinetics of the stereoisomers given that the distribution, metabolism, elimination and toxicity may differ between some pyrethroid isomers (Zhao *et al.*, 2010). In particular, Gaughan *et al.* (1977) showed that *cis*-permethrin was more stored in fat tissues of rats than the *trans*-form.

In a complementary project carried out by the team, literature data on the kinetics of those pesticides have been used to develop a generic toxicokinetic model. Nonetheless, limited human data on the kinetics of permethrin lead to uncertainties in model parameter values. The aim of this study was thus to establish the time courses of permethrin metabolites in accessible biological matrices of orally exposed volunteers to help better derive key parameter values, and hence facilitate interpretation of biomonitoring data and assessment of best sampling strategies.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study design

A controlled kinetic time course study in accessible biological matrices of healthy subjects was conducted following an acute oral exposure to permethrin at a dose below the acute RfD established by the U.S. EPA (2009). Metabolites were measured in urine and blood samples prior to exposure and at predetermined time points post-treatment.

The experimental protocol and consent forms were approved by the Research Ethics Committee of the University of Montreal. All the participants gave their written consent, and were informed of the risks of participating and their right to withdraw from the study at any time. Participants received a monetary compensation for their time and any inconvenience caused.

### 2.2. Subjects

Participants were recruited on a voluntary basis among students of the University of Montreal and their family or friends. Volunteers were young healthy, non-smokers of Caucasian origin and did not take medication. Three male aged from 24 to 37 years old were recruited, weighing 78 to 95 kg and measuring 176 to 190 cm, along with three females aged between 31 and 36 years old, weighing 54 to 70 kg and measuring 162 to 176 cm. They had not been exposed to pyrethroids in the three months prior to dosing, except perhaps through their diet. During the study period and the two-days prior to dosing, they were asked not to eat fruits and vegetables in order to limit ingestion of contaminated food, since it is known that diet is usually the main absorption route of pesticides in non-occupationally exposed adults (Schettgen *et al.*, 2002). They were also requested to avoid consumption of alcohol and drugs during this period, since it can affect metabolism of some chemical compounds by interfering with enzyme activity (Choi *et al.*, 2002; Gueguen *et al.*, 2006).

### 2.3. Dosing and sampling

The experimental dosing and sampling was conducted at the Department of Environmental and Occupational Health of the University of Montreal, Canada. The morning of study onset, a control blood sample was collected from each volunteer 30 min before dosing and a complete urine void was collected during the three hours prior to dosing. Volunteers then ingested a dose of permethrin (*trans/cis*: 60:40; purity > 94%) (EQ laboratory, Atlanta, GA) equivalent to 0.1 mg/kg body wt dissolved in biological olive oil (10 mg/ml olive oil and 0.01 ml administered per kg body weight, corresponding to 7 mg for a 70 kg individual). They then spent the first day of the study in a room at the Department for the first 12-h sampling. On the following 4-day sampling period, participants visited the Department for their daily morning blood sampling and to hand-in urine collections.

Blood samples of 40 ml (4 x 10 ml tubes) were collected at specific times, up to 72 h post-dosing: -0.5, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 48, and 72 h after ingestion (n = 12 samples per individual for a total of 480 ml of blood equivalent to a blood donation). To facilitate collection, a catheter was installed by a nurse prior to dosing. Immediately after collection, blood samples were centrifuged to precipitate red blood cells and isolate plasma. Plasma samples were then split into labelled aliquots and stored at -20°C until analysis.

Total urine voided over specific periods was also collected: -3-0, 0-3, 3-6, 6-9, 9-12, 12-24, 24-36, 36-48, 48-60, 60-72, 72-84 h post-administration (n = 11 collections per individual). Each timed-void was collected in separate polypropylene Nalgene<sup>®</sup> bottles of 1 to 1.5 l already identified. Once collected, urine samples were kept in the refrigerator prior to measurement of total urine volume per void. Each urine collection then was aliquoted in 5 labelled tubes of 15 ml and one bottle of 120 ml before storage at -20°C until analysis.

During the study period, volunteers were further asked to fill a questionnaire to document personal information (weight, height), lifestyle habits (i.e. physical activities, exposure to second-hand smoke or casual smoking), medication intake, alcohol consumption, consumption



of fruits, vegetables and cereals, and possible dosing-related symptoms. They were provided meals prepared with certified biological ingredients during the whole study week.

## 2.4. Chemicals and reagents

Reference standards of *cis*-DCCA, *trans*-DCCA and 3-PBA and the internal standards of  $^{13}\text{C}_2$  1D *trans*-DCCA and  $^{13}\text{C}_6$ -3-PBA (>99% purity) were purchased from Cambridge Isotope Laboratories Inc. (Andover, MA, USA). LC-MS optima grade acetonitrile and methanol, HPLC grade acetic acid and ethyl acetate were obtained from Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada). Compounds used to prepare the exposure dose of volunteers were bought at EQ laboratories (40 *cis*: 60 *trans* isomers; purity > 94%) (Atlanta, GA, USA).  $\beta$ -Glucuronidase/arylsulfatase (100000 Fishman U/ml and 800000 Roy U/ml from Helix pomatia) was obtained from Roche Diagnostics (Laval, Quebec, Canada).

## 2.5. Urine and blood sample treatment

### 2.5.1. Analysis of *cis*-DCCA, *trans*-DCCA and 3-PBA in urine

Urine samples were subjected to an enzymatic hydrolysis to obtain the sum of free and conjugated metabolites followed by a solid phase extraction (SPE) prior to analysis by ultra-high performance liquid chromatography coupled to quadripole time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-MS-Q/ToF). Specifically, 1-ml aliquots of urine of exposed individuals were spiked with 100  $\mu\text{l}$  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. The pH was adjusted to 5 by adding 1 ml acetate buffer (0.1 M) and an enzymatic hydrolysis was performed with 12.5  $\mu\text{l}$  of  $\beta$ -glucuronidase/arylsulfatase for 16 h at 37°C in a shaking bath to measure the sum of free and glucurono- and sulfo-conjugates of permethrin metabolites (Kaneko, 2010; Woollen et al., 1992). Analytes were then extracted 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 flow at 35°C. The residues were resuspended in 500 µl of methanol, centrifuged 30 sec at 3 400 rpm and transferred to vials for analysis.

### 2.5.2. Analysis of *cis*-DCCA, *trans*-DCCA and 3-PBA in plasma

One ml aliquots of plasma of exposed individuals 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. One ml acetate buffer 0.1 M at pH 5 was added and samples were incubated for 16 h with 12.5 µl of  $\beta$ -glucuronidase/arylsulfatase at 37°C. This was followed by a liquid-liquid extraction twice with 4.5 ml of saturated ethyl acetate (agitation for 20 minutes and centrifugation at 3400 rpm for 10 min at 10°C). The upper organic layer from each extraction was combined into a 10-ml glass tube and the solvent was evaporated to dryness under a gentle nitrogen flow at 35°C. The residues were resuspended in 500 µl of methanol, centrifuged 30 sec at 3400 rpm and transferred to vials for analysis by UHPLC-MS-Q/ToF.

### 2.6. UHPLC-MS-Q/TOF analysis

Analysis of *cis*-DCCA, *trans*-DCCA and 3-PBA was performed using an Agilent Model 1290-LC Binary Gradient UHPLC system (Agilent, Mississauga, Canada) connected to an Agilent model 1290- autosampler and thermostated column compartment (Agilent, Mississauga, Canada), and coupled to a Model 6530 quadrupole time-of-flight mass spectrometer (Agilent, Mississauga, Canada) with a jetstream electro-spray ionization (AJS ESI) source. The AJS ESI interface was operated in negative ion mode and its specific ESI-MS parameters were all manually optimized.

The compounds were separated using a  $\text{C}_{18}$  Zorbax Eclipse Plus column (2.1 x 50 mm; 1.8 µm, HD) from Agilent (Mississauga, Canada). The column temperature was maintained at 35°C. The mobile phase consisted of eluent A composed of water and 0.1% acetic acid, and eluent B of methanol with 0.1% acetic acid. Elution was performed in 11 min using a solvent gradient, at a flow rate of 0.5 ml/min. 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 6.2 and 7.2 min. 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 340°C and gas flow rate of 10 l/min; nebulizer gas pressure of 50 psi; drying gas temperature (N<sub>2</sub>) at 365°C and flow rate of 12 l/min; capillary voltage (V<sub>cap</sub>) at 3000 V, nozzle voltage at 0 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 <sup>13</sup>C<sub>2</sub> 1D *trans*-DCCA and 219.07585 for and <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-3-PBA. The A+2 isotope mass of Cl was used for <sup>13</sup>C<sub>2</sub> 1D *trans*-DCCA to avoid interference with the isotope mass of the unlabelled standard. Identification and quantification were performed in Extracted Ion Chromatogram (EIC) mode.

Quantification was obtained from standard calibration curves in urine or in plasma. 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 depending on the analyte. The response factors corresponded to the peak-area ratios of each compound ion to the internal standard ion. Given that the metabolites were easily detectable in all samples of treated volunteers, samples were only concentrated 2-fold following extraction and resuspension step. In these conditions, the limit of detection (LOD) of *trans*-DCCA, *cis*-DCCA and 3-PBA in urine was 1-5 nmol/l of extract (equal to 3 standard deviations of response ratio of replicate analysis of a blank). Repeatability from 10 replicate analysis of urine samples under the same calibration and tuning conditions (blank samples spiked with authentic reference standards at two levels or positive controls) ranged between 1.5 and 4.1%.

## 2.7. Toxicokinetic analysis

To determine toxicokinetic parameters on the basis of blood and urinary time courses of metabolites following oral exposure, we assumed a dynamic equilibrium between tissue and blood levels (blood and tissue levels evolving in parallel) and thus that the body could be represented using a one compartment model with first-order elimination (Renwick, 2008; Tornero-Velez *et al.*, 2012). We also considered a quasi instantaneous metabolism of permethrin to *cis*-DCCA, *trans*-DCCA and 3-PBA (in the order of min compared to h for elimination). Data were thus fitted to the following equation by using a mathematical routine in Mathcad (version 14.0.1.286), which provides a best-fit of a general equation to observed experimental data:  $C(t) = Ae^{-k_{abs}t} + Be^{-k_{elim}t}$  where  $C(t)$  is the blood concentration as a function of time (or urinary excretion rate), A and B are the preexponential coefficients and  $k_{abs}$  and  $k_{elim}$  are the hybrid rate coefficients for the absorption and elimination phases, respectively. Time-to-peak levels ( $T_{max}$ ) along with the apparent absorption ( $\ln 2/k_{abs}$ ) and elimination half-lives ( $\ln 2/k_{elim}$ ) were also determined.

From plasma concentration (C) - time profiles, we further calculated the discrete version of the area under the concentration-time curve (AUC), the area under the first moment of concentration-time curve (AUMC), the mean residence time (MRT), the plasma clearance (CL), the apparent volume of distribution ( $V_d$ ). Equations used to calculate these parameters are:

$$AUC = \frac{1}{2} \sum_{\forall i} (t_i - t_{i+1}) [C(t_i) + C(t_{i+1})]$$

$$AUMC = \frac{1}{2} \sum_{\forall i} (t_i - t_{i+1}) [t_i C(t_i) + t_{i+1} C(t_{i+1})]$$

$$MRT = \frac{AUMC}{AUC}$$

$$CL = \frac{\text{Absorbed dose (fraction of administered dose)}}{AUC}$$

$$V_d = \frac{CL}{k_{elim}}$$

## 3. Results

### 3.1. Time courses of *cis*-DCCA, *trans*-DCCA and 3-PBA in plasma

The time courses of *cis*-DCCA, *trans*-DCCA and 3-PBA in plasma of volunteers following ingestion of permethrin (0.1 mg/kg bw of *trans/cis*: 60:40) are presented in Fig. 1A and appeared to evolve in parallel for all three metabolites. In control samples taken prior to ingestion ( $t_0$ ), concentrations of metabolites of *cis*- and *trans*-DCCA were below the analytical limit of detection or very low, in the respective order of 14.5 and 15.8 pmol/ml in urine and 12.4 and 31.7 pmol/ml in plasma. Following ingestion, plasma levels of *cis*- and *trans*-DCCA and 3-PBA increased progressively with peak levels – hence equilibrium state between absorption and elimination – being observed on average 7 h post-dosing for *cis*- and *trans*-DCCA and 3-PBA.

Tables 1 and 2 present the toxicokinetic parameters calculated from the concentration-time profiles of *cis*- and *trans*-DCCA and 3-PBA in plasma. Absorption rate of all metabolites from plasma was in the order of 0.2-0.3 h<sup>-1</sup>, with a calculated mean apparent absorption  $t_{1/2}$  of 2.4, 3.5 and 3.6 h for *cis*-DCCA, *trans*-DCCA and 3-PBA, respectively. Elimination rate of all metabolites from plasma was in the order of 0.1 h<sup>-1</sup>, with a calculated mean apparent elimination  $t_{1/2}$  of 6.2, 7.1 and 6.5 h for *cis*-DCCA, *trans*-DCCA and 3-PBA, respectively. The mean residence time (MRT) was similar for the three assessed metabolites and of about one work day, which is relatively short compared to other chemical compounds. All metabolites also had relatively small lower-bound estimate of apparent volume of distribution ( $V_d$ ). However, *cis*-DCCA showed a slightly greater clearance rate from plasma than *trans*-DCCA, more than 2-fold on the basis of upper bound estimates.

### 3.2. Time courses of *cis*-DCCA, *trans*-DCCA and 3-PBA in urine

The time courses of *cis*-DCCA, *trans*-DCCA and 3-PBA urinary excretion-rate following ingestion of permethrin are presented in Fig. 1B, and showed that excretion rates evolved in

parallel for all three metabolites. Table 1 indicates that peak excretion rates were observed on average of 8 h post-dosing with mean apparent absorption half-lives of 2.6-2.9 h and mean apparent elimination half-lives of 4.5-5.7 h for all metabolites. Although the time courses of the three metabolites were similar, 3-PBA was present in urine in on average 28% greater amounts than total DCCA. From the cumulative urinary excretion of *cis*-DCCA, *trans*-DCCA and 3-PBA over the 84-h collection period post-dosing (Fig. 2 and Table 1), it was calculated that on average 46% of the molar dose of *trans/cis*-permethrin (60:40) were recovered in urine as 3-PBA as compared to 36% as total DCCA (the sum of *cis*- and *trans*-DCCA). Considering the ratio of *trans/cis*-permethrin in the administered formulation, this translates into an average molar percentage of administered *trans*-permethrin excreted as *trans*-DCCA of 43% and of *cis*-permethrin excreted as *cis*-DCCA of 26% (Table 1).

### 3.3. Comparison of plasma and urinary time courses

As expected, comparison of the plasma and urinary rate time courses in the studied volunteers (Fig. 1) shows that profiles evolve in parallel. Furthermore, for a given metabolite, similar mean apparent absorption and elimination half-lives were calculated from those two matrices (Table 1). However, for all three metabolites, plasma levels (nmol) were about 2.4-7-fold higher than urinary excretion rates (nmol/h), indicating that the transfer rate of metabolites from plasma to urine was approximately  $0.143\text{-}0.411\text{ h}^{-1}$ , corresponding to a half-life of  $\approx 1.7\text{-}4.8\text{ h}$ .

## 4. Discussion

This study allowed a better understanding of the kinetics of key biomarkers of exposure to permethrin following oral exposure, the main route-of-entry in the general population. Results show a rapid kinetics of permethrin and its metabolites in humans following oral exposure, since excretion was almost complete 84 h post-ingestion. Time-to-peak levels of metabolites in plasma (a few hours) were in the same range as that of the parent compound (*circa* 3-4 h according to Gotoh *et al.* (1998)). Gotoh *et al.* (1998) measured permethrin in an intoxicated subject and Anadon *et al.* (1991) quantified permethrin in plasma of rats exposed to very high doses of permethrin (intravenous injection of 46 mg/kg or gastric intubation of 460 mg/kg), but permethrin levels were below the analytical limit of detection in plasma of the volunteers exposed to the low dose of 0.1 mg/kg, in line with a rapid metabolism.

Furthermore, although animal studies showed a partial distribution of the parent compound in fatty tissues (Crawford *et al.*, 1981b), the monophasic elimination of *cis*- and *trans*-DCCA and 3-PBA observed in plasma and urine of our volunteers is indicative of relatively short-term storage in human body tissues. The relatively small lower-bound estimates of volume of distribution ( $V_d$ ) established from the plasma-concentration time courses of all three metabolites also suggest limited tissue distribution and hence that these biotransformation products remain mainly in the circulation. However, the apparent greater clearance rate of *cis*-DCCA from plasma compared to that of *trans*-DCCA is in line with animal data showing slightly greater fatty-tissue distribution of the *cis*-form (considering that the elimination  $t_{1/2}$  ( $k_{elim}$ ) was similar for these two isomers) (Crawford *et al.*, 1981a).

In plasma, the apparent elimination half-lives calculated for *trans*-DCCA, *cis*-DCCA and 3-PBA were in the same range of values as the one reported for permethrin in rats orally exposed ( $\approx 12$  h) (Anadon *et al.*, 1991). In urine, apparent elimination half-lives of the assessed metabolites were similar to those calculated for metabolites of other pyrethroids/pyrethrin (cypermethrin or cyfluthrin, deltamethrin or pyrethrin) following an oral exposure in

volunteers or workers (Eadsforth *et al.*, 1988; Kühn *et al.*, 1999; Leng *et al.*, 1997, 2006; Sams and Jones, 2012; Woollen *et al.*, 1992).

In line with current findings but following oral exposure to cypermethrin (*trans:cis* 50:50) in six volunteers, which generates the same metabolites as permethrin, Woollen *et al.* (1992) reported that on average 28% of dose was recovered in urine as total DCCA (the sum of *cis*- and *trans*-DCCA) over the 0-120 h period post-dosing. This translates into 36% of *trans*-cypermethrin on average being excreted as *trans*-DCCA and 19% of *cis*-cypermethrin recovered as *cis*-DCCA, hence a *cis/trans*- ratio similar to the value for permethrin dosing. Corresponding values for 3-PBA were however slightly lower (on average 13%) than those obtained in our study. Although the assessed metabolites appear as major metabolites, incomplete recovery in urine suggests unaccounted metabolite pathways, partial fecal elimination or incomplete absorption (Anadon *et al.*, 1991; Crawford *et al.*, 1981a, 1981b; Gaughan *et al.*, 1977; Kaneko and Miyamoto, 2001; Kaneko 2010).

In rats, Anadon *et al.* (1991) reported a 90% bioavailability on the basis of comparison of iv and oral plasma data, but inter-species differences cannot be excluded. Individual time courses observed in our volunteers also point out inter-individual variability of up to 300% in excretion of the assessed biomarkers of exposure, showing the importance of considering this factor when reconstructing exposure from biomonitoring results. Such large inter-individual variability in excretion values was also observed in the study in Woollen *et al.* (1992) in six volunteers orally exposed to cypermethrin. In the current work, we controlled for baseline values from dietary intake by providing the same meals to all the volunteers during the course of the study and ensuring a complete compliance to the protocol. However, it cannot be excluded that the amount of blood withdrawn during the study period ( $\approx$ 10% of whole blood volume) may have contributed to increase variability in the rate of distribution of permethrin and its metabolites from blood to tissues as well as permethrin metabolism rate, and hence affect individual time courses of metabolites in plasma and urine.

Overall, for the biomonitoring of pyrethroid exposure using *cis*-DCCA, *trans*-DCCA and 3-PBA, the relatively short half-lives indicate that a steady state-equilibrium should be reached



within three days of a continuous repeated exposure, such as the case of the general population chronically exposed to dietary residues. In workers exposed more acutely by inhalation exposure, almost >75 – 90% of a weekly dose should be eliminated following a two-day weekend without exposure, while values in dermally exposed workers may not return to baseline levels over that period given the potential continued dermal absorption (Tomalik-Scharte *et al.*, 2005). Since DCCA is a metabolite only common to a few pyrethroids (cypermethrin and cyfluthrin), while 3-PBA is a metabolite of a wider range of pyrethroids (cypermethrin, deltamethrin, allethrin, resmethrin, fenvalerate) (Barr *et al.*, 2010), repeated measurements of multiple metabolites of permethrin should allow a better assessment of exposure and the relative contribution of other pyrethroids to observed metabolite levels in urine.

## **Conflict of interest statement**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## **Acknowledgements**

The study was funded by the *Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et sécurité du travail du Québec* (IRSST). Mylène Ratelle received a Ph.D. scholarship from the Faculty of Medicine of the University of Montreal and the University of Montreal's Public Health Research Institute (IRSPUM).

## References

- Anadon, A., Martinez-Larranaga, M.R., Diaz, M.J., Bringas, P. 1991. Toxicokinetics of permethrin in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 110, 1-8.
- Barr, D.B., Olsson, A.O., Wong, L.-Y., Udunka, S., Baker, S.E., Whitehead, R.D.J., Magsumbol, M.S., Williams, B.L., Needham, L.L. 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, 742-748.
- Casida, J.E., Ueda, K., Gaughan, L.C., Jao, L.T., Soderlund, D.M. 1976. Structure-biodegradability relationships in pyrethroid insecticides. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 3(4), 491-500.
- CDC, 2009. Fourth national report on human exposure to environmental chemicals (NHANES). Atlanta (GA), Center for Disease Control and Prevention, 519 pages.
- CHMS, 2013. Second Report on Human Biomonitoring of Environmental Chemicals in Canada. Health Canada's, ISBN: 978-0-660-20754-4.
- Choi, J., Rose, R.L., Hodgson, E. 2002. In vitro human metabolism of permethrin: the role of human alcohol and aldehyde dehydrogenases. *Pest. Biochem. Physiol.* 73, 117-128.
- Choi, J.S., Soderlund, D.M. 2006. Structure-activity relationships for the action of 11 pyrethroid insecticides on rat sodium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 211(3), 233-244.
- Crawford, M.J., Croucher, A., Hutson, D.H. 1981a. Metabolism of *cis*- and *trans*-cypermethrin in rats. Balance and tissue retention study. *J. Agric. Fd Chem.* 29(1), 130-135.
- Crawford, M.J., Croucher, A., Hutson, D.H. 1981b. The metabolism of the pyrethroid insecticide cypermethrin in rats: Excreted metabolites. *Pestic. Sci.* 12: 399-411.

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, 1-12.

Dilek, F., Muranli, G. 2013. Genotoxic and cytotoxic evaluation of pyrethroid insecticides  $\lambda$ -cyhalothrin and  $\alpha$ -cypermethrin on human blood lymphocyte culture. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 90, 357-363.

Eadsforth, C.V., Baldwin, M.K. 1983. Human dose-excretion studies with pyrethroid insecticides cypermethrin. *Xenobiotica* 13, 67-72.

Eadsforth, C.V., Bragt, P.C., van Sittert, N.J. 1988. Human dose-excretion studies with pyrethroid insecticides cypermethrin and alphacypermethrin: relevance for biomonitoring. *Xenobiotica* 18: 603-614.

Gaughan, L.C., Unai, T., Casida, J.E. 1977. Permethrin metabolism in rats. *J. Agric. Fd Chem.* 25, 9-17.

Gotoh, Y., Kawakami, M., Matsumoto, N., Okada, Y. 1998. Permethrin emulsion ingestion: clinical manifestation and clearance of isomers. *Clin. Toxicol.* 36, 57-61.

Gueguen, Y., Mouzat, K., Ferrari, L., Tissandie, E., Lobaccaro, J.M.A., Batt, A.-M., Paquet, F., Voisin, P., Aigueperse, J., Gourmelon, P., Souidi, M., 2006. Cytochromes P450: xenobiotic metabolism, regulation and clinical importance. *Ann. Biol. Clin.* 64 (6), 535-548.

INRS, 2010. Pyrethriñoïdes de synthèse halogénés. On line February 22, 2011 : [http://www.inrs.fr/INRS-PUB/inrs01.nsf/IntranetObjectacesParReference/BIO\\_SD\\_389/\\$File/Visu.html](http://www.inrs.fr/INRS-PUB/inrs01.nsf/IntranetObjectacesParReference/BIO_SD_389/$File/Visu.html)

INSPQ, 2012. Étude sur la présence de résidus chimiques dans les aliements consommés au Québec. Direction de la santé environnementale et de la toxicologie, Gouvernement du Québec, 119 pages. ISBN : 978-2-550-66727-8 .

Kaneko, H. 2010. Pyrethroid chemistry and metabolism, in: Kriedger, R. (Eds), Hayes' Handbook of pesticide toxicology. Academic Press., pp. 1635-1663.

Kaneko, H., Miyamoto, J. 2001. Pyrethroid chemistry and metabolism. Handbook of Pesticide Toxicology, Chapter 58, volume 2, pp. 1263-1288.

Kühn, K.-H., Wieseler, B., Leng, G., Idel, H. 1999. Toxicokinetics of pyrethroid in humans: Consequences for biological monitoring. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 62, 101-108.

Leng, G., Leng, A., Kühn, K.H., Lewalter, J., Pauluhn, J. 1997. Human dose-excretion studies with the pyrethroid insecticide cyfluthrin: urinary metabolite profile following inhalation. Xenobiotica 12, 1273-1283.

Leng, G., Gries, W., Selim, S. 2006. Biomarker of pyrethrum exposure. Toxicology Letter 162, 195-201. Meeker, J.D., Barr, D.B., Hausser, R., 2009. Pyrethroid insecticide metabolites are associated with serum hormone levels in adult men. Rep. Toxicol. 27, 155-160.

Renwick, A.G. 2008. Toxicokinetics, in Principles and Methods of Toxicology, Fifth Edition. by A. Wallace Hayes (eds) at Informa Health Care, New York, USA, 179-230.

Sams, C., Jones, K. 2012. Biological monitoring for exposure to deltamethrin: A human oral dosing study and background levels in the UK general population. Toxicol. Lett. 213, 35-38.

Schettgen, T., Heudorf, U., Drexler, H., Angerer J. 2002. Pyrethroid exposure of the general population – is this due to diet? Toxicol. Lett. 134, 141–145.

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 Met. Dispos. 37, 221-228.

Soderlund, D.M., Clark, J.M., Sheets, L.P., Mullin, L.S., Piccirillo, V.J., Sargent, D., Stevens, J.T., Weiner, M.L. 2002. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. Toxicology 171, 3–59.

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

Tornero-Velez, R., Davis, J., Scollon, E.J., Starr, J.M., Setzer, R.W., *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.

U.S. EPA, 2009. Reregistration eligibility decision (RED) for permethrin. U.S. Environmental Protection Agency, Prevention, Pesticides and Toxic Substances, EPA 738-R-06-017.

Vermeulen, R., Stewart, P., Kromhout, H. 2002. Dermal exposure assessment in occupational epidemiologic research. *Scand. J. Work. Environ. Health* 28, 371-385.

Woollen, B.H., Marsh, J.R., Laird, W.J.D., Lesser, J.E. 1992. The metabolism of Cypermethrin in man: differences in urinary metabolite profiles following oral and dermal administration. *Xenobiotica* 22, 983-991.

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, 1968–1973.

## Captions to figures

Figure 1. Mean time courses of *trans*-DCCA, *cis*-DCCA and 3-PBA in plasma (A) and urine (B) of volunteers ( $\pm$ SD) following a single oral administration of 0.1 mg/kg bw of permethrin (*trans/cis*: 60:40) (n = 6). Symbols represent mean values and vertical bars are standard deviations.

Figure 2. Mean time courses of *trans*-DCCA, *cis*-DCCA and 3-PBA cumulative excretion (as a molar % of administered dose) in the urine of volunteers ( $\pm$ SD) following a single oral administration of 0.1 mg/kg bw of permethrin (*trans/cis*: 60:40) (n=6). Values for *trans*-DCCA and *cis*-DCCA are expressed as a percentage of administered *trans*-permethrin and *cis*-permethrin, respectively. Symbols represent mean values and vertical bars are standard deviations.

**Table 1. Mean time to peak levels, first-order apparent absorption and elimination half-lives and excretion fraction ( $\pm$ SD) derived from individual time courses of *trans*-DCCA, *cis*-DCCA and 3-PBA in plasma and urine of volunteers following ingestion of 0.1 mg kg<sup>-1</sup> bw of permethrin (*trans/cis*: 60:40). (n = 6)**

	Mean $\pm$ SD <sup>a</sup> (n = 6)					
	<i>trans</i> -DCCA		<i>cis</i> -DCCA		3-PBA	
	Plasma	Urine	Plasma	Urine	Plasma	Urine
Time-to-peak levels (h)	7.0 $\pm$ 8.8 <sup>b</sup>	8.3 $\pm$ 5.0	6.9 $\pm$ 8.9 <sup>b</sup>	8.3 $\pm$ 5.0	7.5 $\pm$ 8.7 <sup>b</sup>	8.3 $\pm$ 5.3
Apparent absorption half-life (h)	3.5 $\pm$ 2.8	2.6 $\pm$ 1.8	2.4 $\pm$ 2.5	2.9 $\pm$ 2.1	3.6 $\pm$ 3.0	2.8 $\pm$ 1.9
Apparent elimination half-life (h)	7.1 $\pm$ 8.1	5.4 $\pm$ 0.9	6.2 $\pm$ 8.4	4.5 $\pm$ 1.7	6.5 $\pm$ 0.4	5.7 $\pm$ 0.5
Excreted fraction (molar % of total dose) <sup>c</sup>		25.9 $\pm$ 7.4		10.3 $\pm$ 3.4		45.7 $\pm$ 21.0
Excreted fraction (molar % of isomer dose) <sup>d</sup>		43.1 $\pm$ 12.4		25.7 $\pm$ 8.6		45.7 $\pm$ 21.0

<sup>a</sup> Represents mean  $\pm$  SD values of kinetic parameters derived from individual time course data.

<sup>b</sup> Mean time-to-peak levels ( $\pm$  SD) were calculated from peak values observed for each individual whereas Figure 1A presents mean time courses of the different metabolites and shows that mean peak concentrations were reached at  $\approx$  1.5 h for *trans*- and *cis*-DCCA, and at  $\approx$  2 h for 3-PBA.

<sup>c</sup> Represents the molar percentage of total administered dose of permethrin (*trans/cis*: 60:40) recovered in urine as either *trans*-DCCA, *cis*-DCCA and 3-PBA.

<sup>d</sup> Represents the molar percentage of administered *trans*-permethrin recovered in urine as *trans*-DCCA and of *cis*-permethrin excreted in urine as *cis*-DCCA.



**Table 2. Toxicokinetic parameters calculated from the plasma concentration-time profiles of *trans*-DCCA, *cis*-DCCA and 3-PBA in volunteers following ingestion of 0.1 mg/kg bw of permethrin (*trans/cis*: 60:40) (n = 6).**

Toxicokinetic parameters				Mean ± SD (n = 6)		
				<i>trans</i> -DCCA	<i>cis</i> -DCCA	3-PBA
AUC			73.9 ± 26.7	35.3 ± 46.9	280.4 ± 73.4	
[(nmol x h /l)/kg]						
AUMC			612.8 ± 174.0	128.6 ± 48.1	2968.7 ± 515.0	
[(nmol x h <sup>2</sup> /l)/ kg]						
MRT			9.29 ± 4.99	8.04 ± 5.45	11.66 ± 5.38	
(h)						
CL	Upper estimate <sup>a</sup>	bound	2.33 ± 0.89	6.39 ± 2.45	0.98 ± 0.30	
	Lower estimate <sup>b</sup>	bound	0.98 ± 0.37	1.60 ± 0.62	0.41 ± 0.13	
V <sub>d</sub>	Upper estimate <sup>a</sup>	bound	31.41 ± 49	72.99 ± 125.07	9.18 ± 2.76	
	Lower estimate <sup>b</sup>	bound	12.35 ± 18.50	17.32 ± 29.06	3.90 ± 1.35	

<sup>a</sup> Upper bound estimates of clearance (CL) and volume of distribution (V<sub>d</sub>) of the metabolites in plasma were calculated considering that the absorbed dose is equal to the exposure dose (*i.e.*, absorption fraction of 1).

<sup>b</sup> Lower bound estimates of clearance (CL) and volume of distribution (V<sub>d</sub>) of the metabolites in plasma were calculated considering that the absorbed dose corresponds to total amounts recovered in urine.

Fig. 1- A

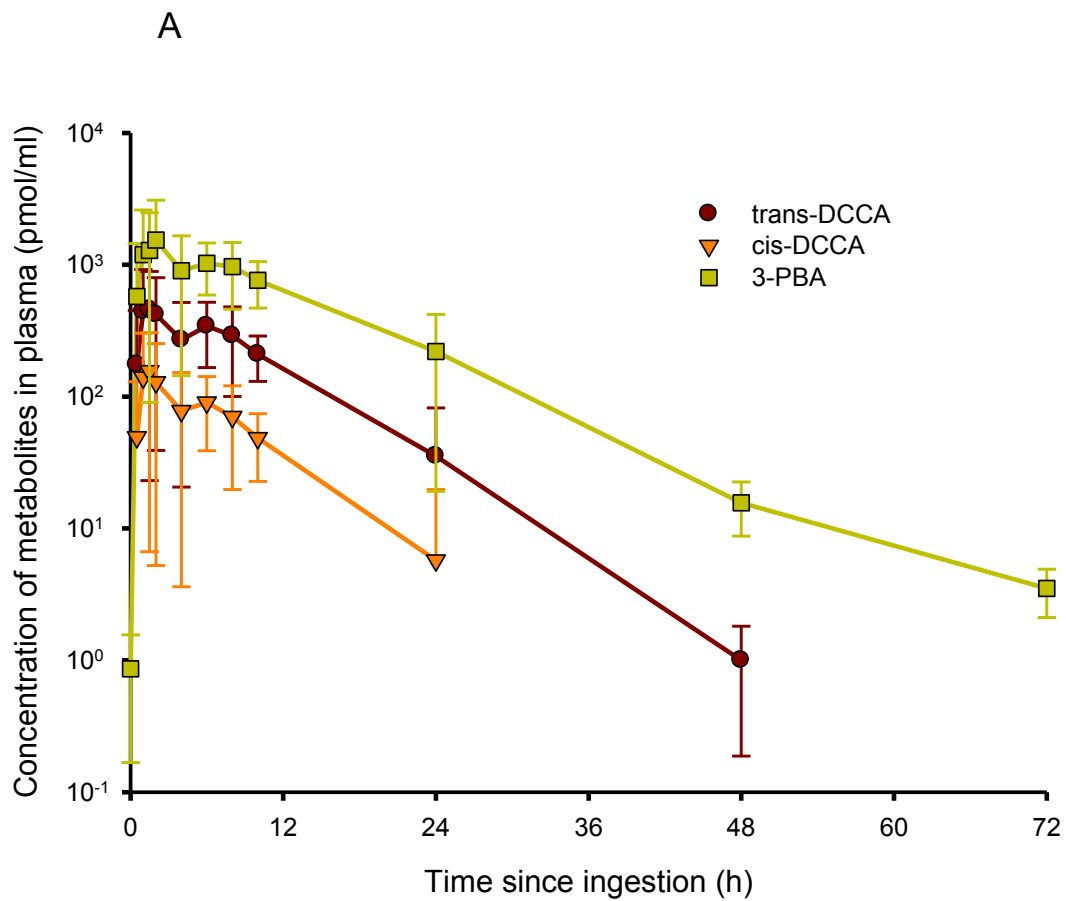


Fig 1-B

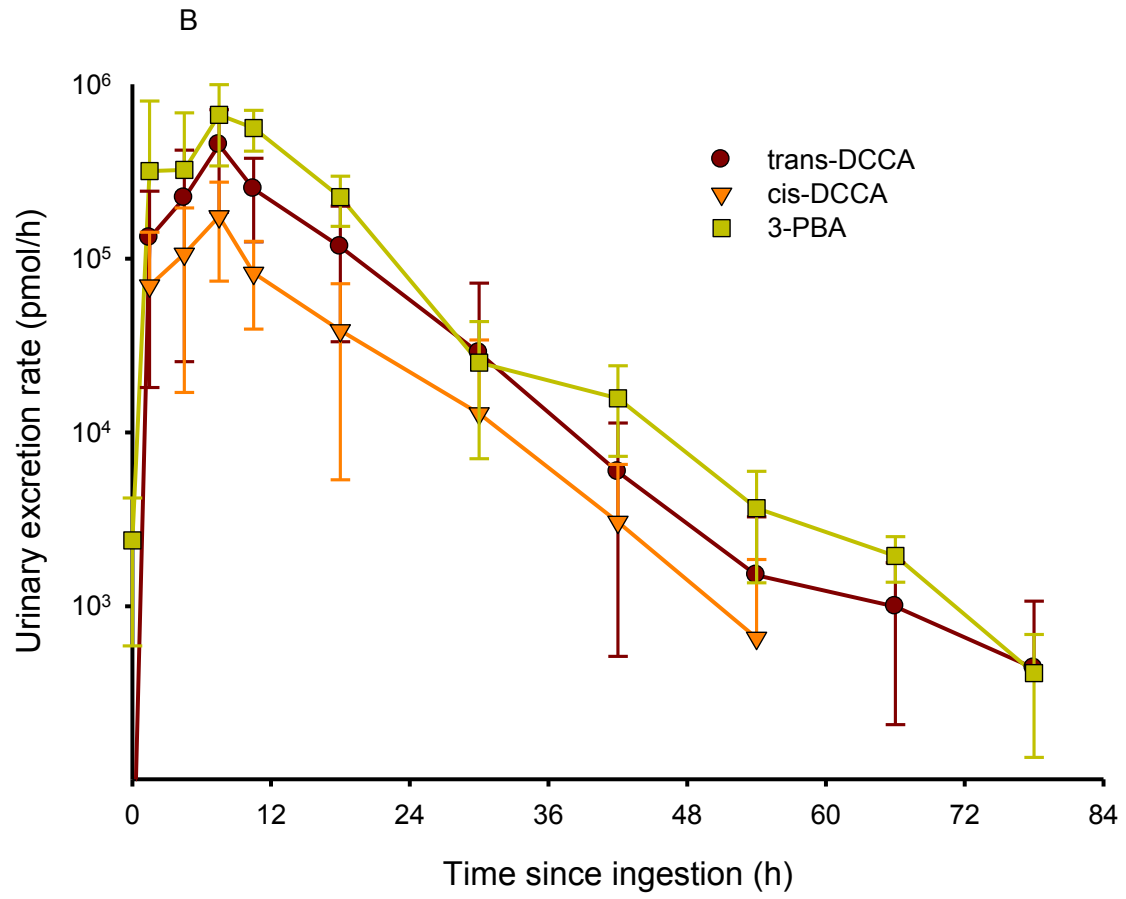
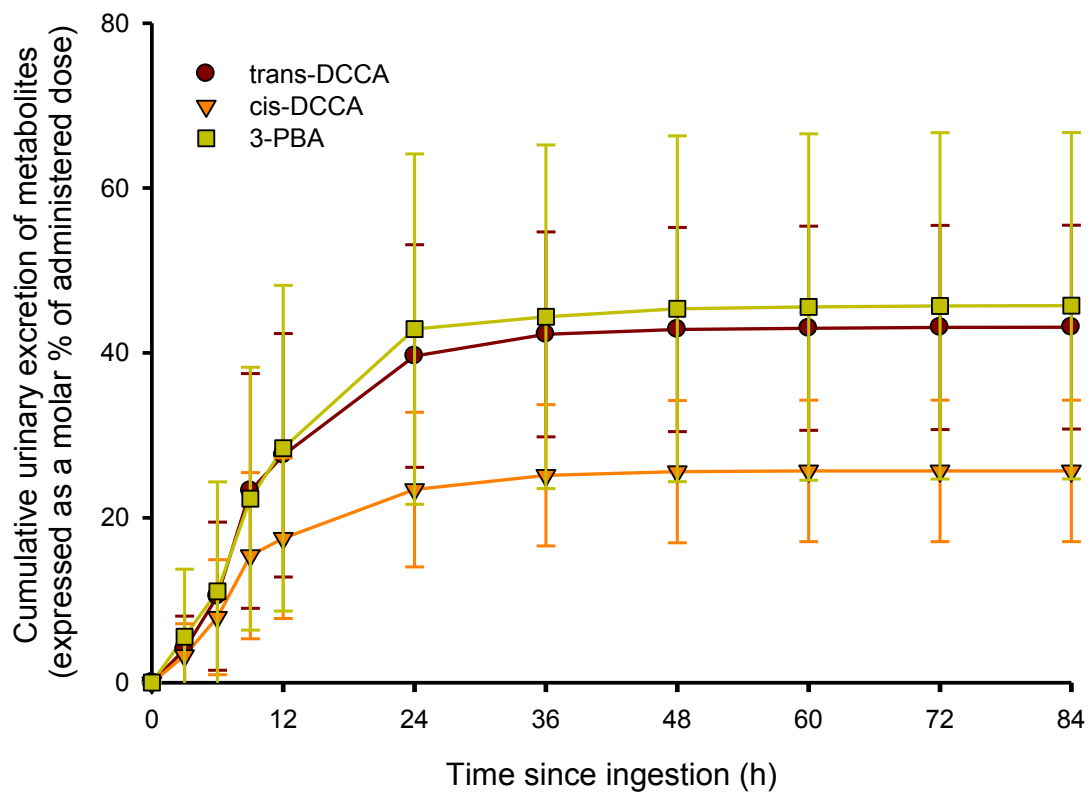


Fig. 2







## Chapitre 4

Article 2: Time profiles and toxicokinetic parameters of key biomarkers of exposure to cypermethrin in orally exposed volunteers compared with previously available kinetic data following permethrin exposure

---

Ratelle, M., Côté, J., Bouchard, M. (2015). Time profiles and toxicokinetic parameters of key biomarkers of exposure to cypermethrin in orally exposed volunteers compared with previously available kinetic data following permethrin exposure. *Journal of Applied Toxicology*, 35(5), doi: 10.1002/jat.3124.



# Time profiles and toxicokinetic parameters of key biomarkers of exposure to cypermethrin in orally exposed volunteers compared with previously available kinetic data following permethrin exposure

## Abstract

Biomonitoring of pyrethroid exposure is largely conducted but human toxicokinetics has not been fully documented. This is essential for a proper interpretation of biomonitoring data. The time profiles and toxicokinetic parameters of key biomarkers of exposure to cypermethrin in orally exposed volunteers have been documented and compared with previously available kinetic data following permethrin dosing. Six volunteers ingested 0.1 mg/kg bw of cypermethrin acutely, separated by a three-week period. Blood samples were taken over 72 h after treatment and complete timed urine voids were collected over 84 h postdosing. *Cis*- and *trans*-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane-1-carboxylic acids (*trans*- and *cis*-DCCA) and 3-phenoxybenzoic acid (3-PBA) metabolites, common to both cypermethrin and permethrin, were quantified. Blood and urinary time courses of all three metabolites were similar following cypermethrin and permethrin exposure. Plasma levels of metabolites reached peak values on average  $\approx$  5-7 h post-dosing; elimination phase showed mean apparent half-lives ( $t_{1/2}$ ) for *trans*-DCCA, *cis*-DCCA and 3-PBA of 5.1, 6.9 and 9.2 h, respectively, following cypermethrin treatment as compared to 7.1, 6.2 and 6.5 h after permethrin dosing. Corresponding mean values obtained from urinary rate time courses were peak values at  $\approx$ 9 h post-dosing and apparent elimination  $t_{1/2}$  of 6.3, 6.4 and 6.4 h for *trans*-DCCA, *cis*-DCCA and 3-PBA, respectively, following cypermethrin treatment as compared to 5.4, 4.5 and 5.7 h after permethrin dosing. These data confirm that the kinetics of cypermethrin is similar to that of permethrin in humans and that their common biomarkers of exposure may be used for an overall assessment of exposure.

**Keywords:** Exposure biomarkers; cypermethrin; permethrin; pyrethroids; DCCA; 3-PBA; oral exposure

# 1. Introduction

Pyrethroids are among the most commonly used insecticides on crops, and they include permethrin and cypermethrin. These compounds act on central and peripheral neural systems of insects by interfering with sodium and calcium channels (Choi and Soderlund, 2006). They can exhibit the same effects in humans, but to a lesser extent (Le Quesne *et al.*, 1980; He *et al.*, 1989). They may also affect the immune and endocrine systems (Dilek and Muranli, 2013; Emara *et al.*, 2007; Madsen *et al.*, 1996; Meeker *et al.*, 2009). The U.S. EPA has provided oral reference doses to prevent adverse effects from acute and chronic ingestion of some pyrethroids on the basis of animal studies (acute and chronic RfD of 0.1 mg/kg/day and 0.06 mg/kg/day for cypermethrin and 0.25 mg/kg/day for permethrin) (U.S. EPA, 2006, 2009).

Permethrin and cypermethrin were shown to have similar metabolism pathways in animals as they differ structurally only by an added cyanide group in the case of cypermethrin (Kaneko *et al.*, 2010). Based on *in vitro* studies on animal and human cells, they are both metabolized in the liver by carboxylesterases and cytochrome P450, through a cleavage of the ester bond (Choi *et al.*, 2002; Crow *et al.*, 2007; Scollon *et al.*, 2009;). Metabolites common to both compounds are generated: *cis*- and *trans*-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane-1-carboxylic acids (*cis*- and *trans*-DCCA) and 3-phenoxybenzoic acid (3-PBA). These metabolites were found to be cleared rapidly from the body according to animal and human studies, mostly as conjugates in urine (Anadon *et al.*, 1991; Crawford *et al.*, 1981a,b; Eadsforth *et al.*, 1988; Sidon *et al.*, 1988; Tomalik-Scharte *et al.*, 2005; Woollen *et al.*, 1992).

Measurements of metabolites in urine have been used to assess exposure to pyrethroids in workers and in the general population (CHMS, 2013; NHANES, 2009; Eadsforth *et al.*, 1988; Hardt and Angerer, 2003; Panuwet *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2007). Spot urine samples were mostly collected, which requires a thorough knowledge of the kinetics to help interpret biomonitoring results. To date, kinetic data following permethrin and cypermethrin exposure are based mostly on animal studies with labeled compounds (Anadon *et al.*, 1991; Crawford *et al.*, 1981a,b; Sidon *et al.*, 1988). Limited human time course data of exposure biomarkers are

available. On the one hand, Woollen *et al.* (1992) determined the time course of *trans*-DCCA, *cis*-DCCA and 3-PBA in the urine of volunteers orally and dermally exposed to cypermethrin, but the blood time courses were not established. On the other hand, Tomalik-Scharte *et al.* (2005) established the urinary excretion time course of DCCA (the sum of *cis*- and *trans*-DCCA) in volunteers and patients dermally treated with permethrin-based solution or cream; however, corresponding oral data are lacking. The blood-concentration time course of permethrin has also been documented but this was assessed in an intoxicated patient (Gotoh *et al.*, 1998).

Although these valuable data concur to provide essential information for the interpretation of biomonitoring results, there is a need for complementary kinetic information for a fuller understanding of the kinetic behavior of *trans*-DCCA, *cis*-DCCA and 3-PBA exposure biomarkers in humans. As they are used as common biomarkers of cypermethrin and permethrin exposure, it is also necessary to verify within a same experimental framework if the kinetics are similar following specific compound exposure.

Furthermore, some differences in the metabolism of the *trans*- and *cis*-form of cypermethrin and permethrin have also been reported. In particular, it was shown in *in vitro* studies that human carboxylesterases (hCE1 et hCE2) hydrolyzed type 1 pyrethroids with the *trans*-form preferentially while an oxidative mechanism was favored for the *cis*-form of type 1 pyrethroids (Ross *et al.*, 2006; Scollon *et al.*, 2009). Nonetheless, the impact of such metabolism differences on the overall excretion time courses of metabolites has yet to be determined. Recently, the time courses of permethrin metabolites have been documented in the blood and urine of volunteers orally exposed to permethrin (Ratelle *et al.*, 2015). The objectives of the current study were i) to use the same experimental protocol to document the blood and urinary time courses of *cis*-DCCA, *trans*-DCCA and 3-PBA (along with toxicokinetic parameters) in volunteers exposed to (*trans*-/*cis*-)cypermethrin and ii) perform a systematic comparison with the kinetics of permethrin and its metabolites to help better assess biomonitoring data.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study design

A controlled kinetic time course study in accessible biological matrices of healthy subjects was conducted following an acute oral exposure to cypermethrin at a dose below the acute RfD established by the U.S. EPA (U.S. EPA, 2006, 2009). This study was compared to a previous kinetic study following a similar design but an exposure to permethrin (Ratelle et al., 2015). Metabolites were measured in blood and urine samples prior to exposure and at predetermined time points post-treatment. For both cypermethrin and permethrin exposure, the same volunteers and sampling protocols were used, separated by a three-week period.

The experimental protocol and consent forms were approved by the Research Ethics Committee of the University of Montreal. All the participants gave their written consent and were informed of the risks of participating and their right to withdraw from the study at anytime. The participants received a monetary compensation for their time and any inconvenience caused.

### 2.2. Subjects

Participants were recruited on a voluntary basis among students of the University of Montreal and their family and friends. Volunteers were young healthy, non-smokers of Caucasian origin and did not take medication. Three male aged from 24 to 37 years old were recruited, weighing 68 to 95 kg and measuring 176 to 190 cm, along with three females aged between 31 and 36 years old, weighing 54 to 70 kg and measuring 162 to 176 cm. Five of the six same subjects were exposed to cypermethrin and permethrin, with a three-week period between dosing. They had not been exposed to pyrethroids in the three months prior to the experimental dosing protocol, except perhaps through their diet. During the study period and the two-days prior to each dosing, they were asked not to eat fruits and vegetables in order to limit ingestion of contaminated food, since it is known that diet is usually the main absorption route of pesticides in the general population (Schettgen *et al.*, 2002). They were also requested

to avoid consumption of alcohol and drugs during this period, since it can affect metabolism of some chemical compounds by interfering with enzyme activity (Choi *et al.*, 2002; Gueguen *et al.*, 2006).

### 2.3. Dosing and sampling

The experimental dosing and sampling were conducted at the Department of Environmental and Occupational Health of the University of Montreal, Canada. The morning of study onset, a control blood sample was collected from each volunteer 30 min before dosing and a complete urine void was collected during the three hours prior to dosing. Volunteers (n=6 per group) then ingested a dose of 0.1 mg kg<sup>-1</sup> body wt of cypermethrin (*trans/cis*: 58:42) similar to previous study of Ratelle *et al.* (2014) with permethrin (*trans/cis*: 60:40) (purity > 94%; EQ laboratory, Atlanta, GA). The compounds administered were dissolved in biological olive oil and following dosing, volunteers were given 60 ml of water. The tip used for dosing was then rinsed with pure oil and administered to the participants with again 60 ml of water.

Blood samples of 40 ml (4 x 10 ml tubes) were collected at specific times, up to 72 h post-dosing: -0.5, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 48, and 72 h after ingestion (n = 12 samples per individual per dosing). To facilitate collection, a catheter was installed by a nurse prior to dosing. Blood was withdrawn by the nurse into vacutainers with a code, the date and time of sampling. Immediately after collection, blood samples were centrifuged to precipitate red blood cells and isolate plasma. Plasma samples were then split into labelled aliquots and stored at -20°C until analysis.

Total urine voided over specific periods was also collected: -3-0, 0-3, 3-6, 6-9, 9-12, 12-24, 24-36, 36-48, 48-60, 60-72, 72-84 h post-administration (n = 11 collections per individual per dosing). To assist participants, they received a schedule specifying the date and the required time of urine collection. They then only had to complete the sheet with the actual time of collection and to indicate whether or not there were any urine losses. Each timed-void was collected in separate polypropylene Nalgene<sup>®</sup> bottles of 1 to 1.5 l already identified. Once collected, urine samples were kept in the refrigerator prior to measurement of total urine

volume per void. Each urine collection then was aliquoted in 5 labelled tubes of 15 ml and one bottle of 120 ml before storage at -20°C until analysis.

Volunteers spent the first 12-h postdosing in a room at the Department. On the following 4-day sampling period, participants visited the Department for their daily morning blood sampling and to hand-in urine collections. During the study period, volunteers were further asked to fill a questionnaire to document personal information (weight, height), life habits (i.e. physical activities, exposure to second-hand smoke or casual smoking) as well as consumption of drugs, alcohol, fruits, vegetables and cereals during the two-days prior to each dosing, and possible dosing-related symptoms. They were provided meals prepared with certified organic ingredients during the whole study week.

## 2.4. Sample treatment and analysis

### 2.4.1. Chemicals and reagents

Reference standards of *cis*-DCCA, *trans*-DCCA and 3-PBA and the internal standards of  $^{13}\text{C}_2$  1D *trans*-DCCA and  $^{13}\text{C}_6$ -3-PBA (>99% purity) were purchased from Cambridge Isotope Laboratories Inc. (Andover, MA, USA). LC-MS optima grade acetonitrile and methanol, HPLC grade acetic acid and ethyl acetate were obtained from Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada). Compounds used to prepare the exposure dose of volunteers were bought at EQ laboratories (40 *cis*: 60 *trans* isomers for permethrin and 42:58 for cypermethrin; purity > 94%) (Atlanta, GA, USA).  $\beta$ -Glucuronide/arylsulfatase (100000 Fishman U ml-1 and 800000 Roy U ml-1 from *Helix pomatia*) was obtained from Roche Diagnostics (Laval, Quebec, Canada).

### 2.4.2. Blood and urine sample treatment

One ml aliquots of plasma of exposed individuals were spiked with 100  $\mu\text{l}$  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. One ml acetate buffer 0.1 M at pH 5 was added and samples were incubated for 16 h with 12.5  $\mu\text{l}$  of  $\beta$ -glucuronidase/arylsulfatase at 37°C in a shaking bath to obtain the sum of free and conjugated

metabolites. This was followed by a liquid-liquid extraction twice with 4.5 ml of saturated ethyl acetate (agitation for 20 minutes and centrifugation at 3400 rpm for 10 min at 10°C). The upper organic layer from each extraction was combined into a 10-ml glass tube and the solvent was evaporated to dryness under a gentle nitrogen flow at 35°C. The residues were resuspended in 500 µl of methanol, centrifuged 30 sec at 3400 rpm and transferred to vials for analysis.

One-ml aliquots of urine of exposed individuals 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. The pH was adjusted to 5 by adding 1 ml acetate buffer (0.1 M) and an enzymatic hydrolysis was performed with 12.5 µl of β-glucuronidase/arylsulfatase for 16 h at 37°C. Analytes were then extracted 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 flow at 35°C. The residues were resuspended in 500 µl of methanol, centrifuged 30 sec at 3 400 rpm and transferred to vials for analysis.

#### 2.4.3. Blood and urine sample analysis

Analysis of *cis*-DCCA, *trans*-DCCA and 3-PBA was performed using an Agilent Model 1290-LC Binary Gradient UHPLC system (Agilent, Mississauga, Canada) connected to an Agilent model 1290- autosampler and thermostated column compartment (Agilent, Mississauga, Canada), and coupled to a Model 6530 quadrupole time-of-flight mass spectrometer (Agilent, Mississauga, Canada) with a jetstream electro-spray ionization (AJS ESI) source. The AJS ESI interface was operated in negative ion mode and its specific ESI-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 column temperature was maintained at



35°C. The mobile phase consisted of eluent A composed of water and 0.1% acetic acid, and eluent B of methanol with 0.1% acetic acid. Elution was performed in 11 min using a solvent gradient, at a flow rate of 0.5 ml/min. 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 6.2 and 7.2 min. 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 340°C and gas flow rate of 10 l/min; nebulizer gas pressure of 50 psi; drying gas temperature (N<sub>2</sub>) at 365°C and flow rate of 12 l/min; capillary voltage (V<sub>cap</sub>) at 3000 V, nozzle voltage at 0 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 <sup>13</sup>C<sub>2</sub> 1D *trans*-DCCA and 219.07585 for and <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-3-PBA. The A+2 isotope mass of Cl was used for <sup>13</sup>C<sub>2</sub> 1D *trans*-DCCA to avoid interference with the isotope mass of the unlabelled standard. Identification and quantification were performed in Extracted Ion Chromatogram (EIC) mode.

Quantification was obtained from standard calibration curves in urine or in plasma. 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 depending on the analyte. The response factors corresponded to the peak-area ratios of each compound ion to the internal standard ion. Given that the metabolites were easily detectable in all samples of treated volunteers, samples were not concentrated following extraction and resuspension step. In these conditions, the limit of detection (LOD) of *trans*-DCCA, *cis*-DCCA and 3-PBA in urine was 1-5 nmol/l of extract (equal to 3 standard deviations of response ratio replicate analysis of a blank divided by mean slope of the standard curves) Repeatability from 10 replicate analysis of urine

samples under the same calibration and tuning conditions (blank samples spiked with authentic reference standards at two levels or positive controls) ranged between 1.5 and 4.1%.

## 2.5. Toxicokinetic analysis

To determine toxicokinetic parameters on the basis of blood and urinary time courses of metabolites following oral exposure, we assumed a dynamic equilibrium between tissue and blood levels (blood and tissue levels evolving in parallel) and thus that the body could be represented using a one compartment model with first-order elimination (Renwick, 2008; Tornero-Velez *et al.*, 2012). We also considered a quasi instantaneous metabolism of permethrin to *cis*-DCCA, *trans*-DCCA and 3-PBA (in the order of min compared to h for elimination). Data were thus least-square fitted (with Mathcad version 14.0.1.286) to the following equation, which provides a best-fit of a general equation to observed experimental data:  $C(t) = Ae^{-k_{abs}t} + Be^{-k_{elim}t}$  where  $C(t)$  is the blood concentration as a function of time (or urinary excretion rate),  $A$  and  $B$  are the preexponential coefficients and  $k_{abs}$  and  $k_{elim}$  are the hybrid rate coefficients for the absorption and elimination phases, respectively. Time-to-peak levels ( $T_{max}$ ) along with the apparent absorption ( $\ln 2/k_{abs}$ ) and elimination half-lives ( $\ln 2/k_{elim}$ ) were also determined. From plasma concentration ( $C$ ) -time profiles, we further calculated the discrete version of the area under the concentration-time curve (AUC), the area under the first moment of concentration-time curve (AUMC), the mean residence time (MRT), the plasma clearance (CL), the apparent volume of distribution ( $V_d$ ). Equations used to calculate these parameters are:

$$AUC = \frac{1}{2} \sum_{\forall i} (t_i - t_{i+1}) [C(t_i) + C(t_{i+1})]$$

$$AUMC = \frac{1}{2} \sum_{\forall i} (t_i - t_{i+1}) [t_i C(t_i) + t_{i+1} C(t_{i+1})]$$

$$MRT = \frac{AUMC}{AUC}$$

$$CL = \frac{\text{Absorbed dose (fraction of administered dose)}}{AUC}$$

$$Vd = \frac{CL}{k_{elim}}$$

# Results

## 3.1. Time courses of metabolites in plasma following cypermethrin exposure

The time courses of *cis*-DCCA, *trans*-DCCA and 3-PBA in plasma of volunteers following ingestion of cypermethrin ( $0.1 \text{ mg kg}^{-1} \text{ bw}$  of *trans/cis*: 58:42) are presented in Fig. 1A and appeared to evolve in parallel for all three metabolites. Following ingestion, a progressive rise in plasma levels of *cis*- and *trans*-DCCA and 3-PBA was observed, with peak levels being reached on average 5 to 7 h post-dosing.

From the concentration-time profiles of *cis*- and *trans*-DCCA and 3-PBA in plasma following cypermethrin ingestion, several toxicokinetic parameters were calculated (Tables 1 and 2). Absorption rate of all metabolites from plasma was in the order of  $0.2 \text{ h}^{-1}$ , with a calculated mean apparent absorption  $t_{1/2}$  of 3.0-4.2 h. Elimination rate of all metabolites from plasma was in the order of  $0.1 \text{ hours}^{-1}$ , with corresponding mean apparent elimination  $t_{1/2}$  of 5.1-9.2 h. The mean residence time (MRT) was similar for the three metabolites and of about one work day. All metabolites also had relatively small lower-bound estimate of apparent volume of distribution ( $V_d$ ) while upper bound estimates indicate a tissue distribution. *cis*-DCCA showed a greater clearance rate from plasma than *trans*-DCCA.

## 3.2. Time courses of metabolites in urine following cypermethrin exposure

Fig 1 B depicts the time courses of *cis*-DCCA, *trans*-DCCA and 3-PBA urinary excretion rate following ingestion of cypermethrin. As expected, these profiles evolved in unison with the blood profiles. Table 1 indicates that peak excretion rates were observed on average of 8-9 h post-dosing with mean apparent elimination half-lives of 6.3-6.4 h for all metabolites, confirming similar time courses of the three metabolites. However, total DCCA was present in urine in 1.3-fold greater amounts than 3-PBA on average. It was calculated that on average 27.2% of the molar dose of *trans/cis*-cypermethrin (58:42) were recovered in urine as 3-PBA over the 84-h collection period post-dosing as compared to 36.4% as total DCCA (the sum of *cis*- and *trans*-DCCA) (Fig. 2 and Table 1). This corresponds to an average molar percentage

of administered *trans*-cypermethrin excreted as *trans*-DCCA of 43.9% and of *cis*-cypermethrin excreted as *cis*-DCCA of 26.2% (Table 1).

### 3.3. Comparison of metabolite times courses following cypermethrin and permethrin exposure

Table 3 shows metabolite profiles following cypermethrin compared with data of Ratelle et al. (2015) following permethrin exposure. Metabolites originating from cypermethrin exposure exhibited time courses very similar to the ones observed following permethrin dosing. Comparison of toxicokinetic parameters also indicates  $T_{max}$ ,  $k_{abs}$ ,  $k_{elim}$ , MRT,  $V_d$ , AUC, AUMC values in the same range following both exposure (Tables 1-2 for cypermethrin as compared to Ratelle *et al.* (2014) for permethrin). The average molar percentages of administered *trans*-form excreted as *trans*-DCCA and of *cis*-form excreted as *cis*-DCCA were also similar following cypermethrin and permethrin ingestion (on average 44 and 26% for cypermethrin; on average 43 and 26% for permethrin). For 3-PBA, corresponding average values were slightly lower following cypermethrin ingestion than permethrin dosing (27 and 46%, respectively), but this may be explained by variability (large standard deviation of 17 and 21%, respectively) as similar mean AUMC were obtained from plasma curves for both cypermethrin and permethrin exposure.

## Discussion

This study provided complementary information on the time courses of key biomarkers of exposure to cypermethrin a systematic comparison with previously available biomarker data following permethrin exposure in humans (Ratelle *et al.*, 2015). It allowed confirming similar kinetics of metabolites common to both compounds. From a biomonitoring perspective, measurements of *cis*-DCCA and *trans*-DCCA in combination with 3-PBA should provide a good indication of combined exposure to those pyrethroids. Although *cis*- and *trans*-DCCA are metabolites of permethrin, cypermethrin and cyfluthrin only, 3-PBA can be generated from the metabolism of a larger number of pyrethroids ( $\lambda$ -cyhalothrin, deltamethrin, allethrin, resmethrin, esfenvalerate, fenpropathrin, flucythrinate, fluvalinate, phenothrin) (Barr *et al.*, 2007; 2010). DCCA/3-PBA metabolite ratios may then be used to infer on potential concomitant exposure to pyrethroids other than DCCA-generating compounds. 3-PBA may however also be formed from other non-pyrethroid compounds.

As reported more specifically for permethrin in Ratelle *et al.* (2014), a rapid clearance of metabolites was observed following cypermethrin exposure. Results obtained for cypermethrin were in complete agreement with the available urinary time course data of *trans*-DCCA, *cis*-DCCA and 3-PBA reported by Woollen *et al.* (1992) in volunteers orally exposed to cypermethrin. Apparent elimination half-lives of the assessed metabolites were also similar to those calculated for other pyrethroids/pyrethrin (cyfluthrin, deltamethrin or pyrethrin) following an oral exposure in volunteers or workers (Eadsforth *et al.*, 1988; Khun *et al.*, 1999; Leng *et al.*, 1996, 1997; Sams and Jones, 2012; Woollen *et al.*, 1992). This suggests that the time profiles of the different biomarkers of exposure to pyrethroids following oral exposure may be governed by the same essential biological determinants; some of the toxicokinetic parameters obtained in this study may thus be extrapolated to other pyrethroids. According to Côté *et al.* (2014), metabolism rate is not a limiting step in the excretion kinetics of permethrin and cypermethrin; oral absorption rate is also faster than the elimination rate.

When translating these kinetic results to biomonitoring data in the general population exposed mainly through ingestion, peak levels of metabolites in the sampled biological matrix should be observed about 8-9 h post-exposure; the elimination should be almost complete 48-72 h after a daily exposure indicating that steady-state equilibrium should be reached following three-consecutive days of exposure. On the basis of these observations, there should also be limited accumulation from week to week provided exposure is relatively constant through time. Similar kinetic patterns should be observed following inhalation, which may occur in workers following pesticide application, although peak levels are expected to occur more rapidly. Again, most of the absorbed pyrethroid compound (> 75%) should be eliminated from the body following a 2 to 3-day period without exposure. In dermally exposed workers, the relatively slower absorption rate may influence the rate of elimination and appearance of metabolites in urine (Côté *et al.*, 2014; Tomalik-Scharte *et al.*, 2005; Woollen *et al.*, 1992). In the case of dermal exposure, potential contribution of dermal metabolism should also be further assessed (Woollen *et al.*, 1992).

Furthermore, although some studies reported that there are differences in the fatty-tissue distribution and metabolism rate of the *cis*- and *trans*-isomers of pyrethroids (Crawford *et al.* 1981a,b; Nishi *et al.*, 2006; Scollon *et al.*, 2009), our results show that this had negligible effect on the excretion time course curves of metabolites. However, *cis*-DCCA was present in lower concentrations than *trans*-DCCA in both plasma and urine (*trans/cis*-DCCA ratio of 1.7 for both cypermethrin and permethrin on the basis of cumulative amounts of administered *trans*-isomer recovered in urine as *trans*-DCCA and of administered *cis*-isomer excreted as *cis*-DCCA). Similar to our findings, Woollen *et al.* (1992) also reported that on average 36% of administered *trans*-cypermethrin was excreted as *trans*-DCCA and 19% of ingested *cis*-cypermethrin recovered as *cis*-DCCA in urine over the 0-120 h period post-dosing (*trans/cis*-DCCA ratio of 2). This suggests a greater faecal excretion and/or transient tissue-storage of the *cis*-form than the *trans*-form, as observed in animals (Crawford *et al.*, 1981a,b). Animal studies have shown that the *cis*- form had a greater affinity for fat tissues than the *trans*-isomer and a favored faecal excretion after oral dosing (Crawford *et al.* 1981a,b). *In vitro* studies on animal and human cells also indicate that the *trans*-form of permethrin and cypermethrin was

metabolized more rapidly than the *cis*-form (Nishi *et al.*, 2006; Ross *et al.*, 2006; Scollon *et al.*, 2009). There may also be isomeric differences in the formation of metabolites other than DCCA following exposure to the *trans*- and *cis*-forms, such as oxidative derivatives of the parent molecule (Kaneko and Miyamoto, 2001)

In line with results of other studies, inter-individual variability in excretion values was found to be substantial between volunteers in our study (up to 540%), even after controlling for ethnicity (well-educated, Caucasians recruited), sampling times and background exposure (volunteers provided with the biological meals during the whole study period). Although it is a limiting aspect of controlled studies with small sample size, this factor also needs to be accounted for when attempting to reconstruct daily absorbed doses of pyrethroids from biomonitoring data in workers or the general population. Moreover, as in other studies (Berthet *et al.*, 2012), our urinary data show important void-to-void variations in excretions and highlight the importance of collecting time-urine voids over the longest possible period of time when performing routine biomonitoring. The data obtained in this study will be used to refine a toxicokinetic model developed for dose reconstruction in exposed individuals from biomonitoring data (Côté *et al.*, 2014); consideration of variability in the model will help estimate lower and upper bound estimates of reconstructed daily doses.

In summary, in addition to providing novel human data for toxicokinetic modeling, this study along with the few other human kinetic studies on pyrethroids point out valuable information on the biological determinants governing the overall time courses of the assessed exposure biomarkers. This sets the basis for future time course studies of exposure biomarkers in workers for a more comprehensive interpretation of data, and thus better assessment of associated health risk.

## **Conflicts of interest statement**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## **Acknowledgements**

The study was funded by the *Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et sécurité du travail du Québec* (IRSST). Mylène Ratelle received a Ph.D. scholarship from the Faculty of Medicine of the University of Montreal and the University of Montreal's Public Health Research Institute (IRSPUM).



## References

Anadon A, Martinez-Larranaga MR, Diaz MJ, Bringas P, 1991. Toxicokinetics of permethrin in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 110: 1-8.

Barr DB, Leng G, Berger-Preiss E, Hoppe HW, Weerasekera G, Gries W, Gerling S, Perez J, Smith K, Needham LL, Angerer J, 2007. Cross validation of multiple methods for measuring pyrethroid and pyrethrum insecticide metabolites in human urine. *Anal. Bioanal. Chem.* 389: 811-818.

Barr DB, Olsson AO, Wong LY, Udunka S, Baker SE, Whitehead RDJ, Magsumbol MS, Williams BL, Needham LL, 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: 742-748.

Berthet A, Bouchard M, Valcke M, Heredia-Ortiz R, 2012. Using a toxicokinetic modeling approach to determine Biological Reference Values (BRVs) and to assess human exposure to pesticides. In *Impact of Pesticides*, Milan Jokanovic, Academy Publish: Cheyenne; 105-142

CHMS, 2013. Second Report on Human Biomonitoring of Environmental Chemicals in Canada. Health Canada's, ISBN: 978-0-660-20754-4.

Choi J, Rose RL, Hodgson E, 2002. In vitro human metabolism of permethrin: the role of human alcohol and aldehyde dehydrogenases. *Pest. Biochem. Physiol.* 73: 117-128.

Choi JS, and Soderlund DM, 2006. Structure-activity relationships for the action of 11 pyrethroid insecticides on rat Na<sup>v</sup>1.8 sodium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 211(3):233-244.

Côté J, Bonvalot Y, Carrier G, Lapointe C, Fuhr U, Tomalik-Scharte D, Wachall B, Bouchard M. 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.

Crawford MJ, Croucher A, Hutson DH, 1981a. Metabolism of cis- and trans-cypermethrin in rats. Balance and tissue retention study. *J. Agric. Food Chem.* 29(1):130-135.

Crawford MJ, Croucher A, Hutson DH, 1981b. The metabolism of the pyrethroid insecticide cypermethrin in rats: Excreted metabolites. *Pestic. Sci.* 12: 399-411.

Crow JA, Borazjani A, Potter PM, Ross MK, 2007. Hydrolysis of pyrethroids by human and rat tissues: examination of intestinal, liver and serum carboxylesterases. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 221: 1-12.

Dilek F, Muranli G, 2013. Genotoxic and cytotoxic evaluation of pyrethroid insecticides  $\lambda$ -cyhalothrin and  $\alpha$ -cypermethrin on human blood lymphocyte culture. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 90: 357-363.

Eadsforth CV, Bragt PC, van Sittert NJ, 1988. Human dose-excretion studies with pyrethroid insecticides cypermethrin and alphacypermethrin: relevance for biomonitoring. *Xenobiotica* 18: 603-614.

Emara AM, Draz EI, 2007. Immunotoxicological study of one of the most common over-the-counter pyrethroid insecticide products in Egypt. *Inhal. Toxicol.* 19: 997-1009.

Gotoh Y, Kawakami M, Matsumoto N, Okada Y, 1998. Permethrin emulsion ingestion: clinical manifestation and clearance of isomers. *Clin. Toxicol.* 36: 57-61.

Gueguen Y, Mouzat K, Ferrari L, Tissandie E, Lobaccaro JMA, Batt AM, Paquet F, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P, Souidi M, 2006. Cytochromes P450: xenobiotic metabolism, regulation and clinical importance. *Ann. Biol. Clin.* 64 (6): 535-548.

Hardt J, Angerer J, 2003. Biological monitoring of workers after the application of insecticidal pyrethroids. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 76(7): 492-8.

He F, Wang S, Liu L, Chen S, Zhang Z, Sun J, 1989. Clinical manifestations and diagnosis of acute pyrethroid poisoning. *Arch. Toxicol.* 63: 54-58.

Kaneko H, Miyamoto J, 2001. Pyrethroid chemistry and metabolism. In *Handbook of Pesticide Toxicology*, Robert Krieger, Academic press, San Diego, 1263-1288.

Kaneko H, 2010. Pyrethroid chemistry and metabolism, in: Krieger, R. (Eds), In *Handbook of Pesticide Toxicology*, Robert Krieger, Academic press: San Diego; 1635-1663.

Kühn KH, Wieseler B, Leng G, Idel H, 1999. Toxicokinetics of pyrethroid in humans: consequences for biological monitoring. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 62: 101-108.

Le Quesne PM, Maxwell IC, Butterworth STG, 1980. Transient facial sensory symptoms following exposure to synthetic pyrethroids: a clinical and electrophysiological assessment. *Neurotoxicol.* 2: 1-11.

Leng G, Leng A, Kühn KH, Lewalter J, Pauluhn J, 1997. Human dose-excretion studies with the pyrethroid insecticide cyfluthrin: urinary metabolite profile following inhalation. *Xenobiotica.* 12: 1273-1283.

Leng G, Gries W, Selim S, 2006. Biomarker of pyrethrum exposure. *Toxicol. Lett.* 162: 195-201.

Madsen C, Claesson MH, Ropke C, 1996. Immunotoxicity of the pyrethroid insecticides deltamethrin and alpha-cypermethrin. *Toxicol.* 3: 219-227.

Meeker JD, Barr DB, Hausser R, 2009. Pyrethroid insecticide metabolites are associated with serum hormone levels in adult men. *Rep. Toxicol.* 27: 155-160.

NHANES, 2009. Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. National Health and Nutrition Examination Survey, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia.

Nishi K, Huang H, Kamita SG, Kim I-H, Morisseau C, Hammock BD. 2006. Characterization of pyrethroid hydrolysis by the human liver carboxylesterases hCE-1 and hCE-2. *Arch. Biochem. Biophys.* 445: 115-123.

Panuwet P, Prapamontol T, Chantara S, Thavornyuthikarn P, Montesano MA, Whitehead RD, Jr., Barr DB. 2008. Concentrations of urinary pesticide metabolites in small-scale farmers in Chiang Mai province, Thailand. *Sci. Total Environ.* 407(1): 655-68.

Ratelle M, Côté J, Bouchard M, 2015. Toxicokinetics of permethrin biomarkers of exposure in orally exposed volunteers. *Toxicol. Lett.* (in press).

Renwick AG, 2008. Toxicokinetics. In *Principles and Methods of Toxicology*, Fifth Edition, A. Wallace Hayes, Informa Health Care: New York; 179-230.

Sams C, Jones K, 2012. Biological monitoring for exposure to deltamethrin: A human oral dosing study and background levels in the UK general population. *Toxicol. Lett.* 213: 35-38.

Schettgen T, Heudorf U, Drexler H, Angerer J, 2002. Pyrethroid exposure of the general population – is this due to diet? *Toxicol. Lett.* 134: 141–145.

Scollon EJ, Starr JM, Godin SJ, DeVito MJ, Hughes MF, 2009. In vitro metabolism of pyrethroid pesticides by rat and human hepatic microsomes and cytochrome p450 isoforms. *Drug Met. Dispos.* 37: 221-8.

Sidon EW, Moody RP, Franklin CA, 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.

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

Tornero-Velez R, Davis J, Scollon EJ, Starr JM, Setzer RW, 2012. A Pharmacokinetic model of *cis*- and *trans*-permethrin disposition in rats and humans with aggregate exposure application. *Toxicol. Sci.* 130(1): 33–47.

U.S. EPA, 2006. Reregistration Eligibility Decision (RED) for Cypermethrin. U.S. Environmental Protection Agency, Prevention, Pesticides and Toxic Substances, EPA-HQ-OPP-2005-0293-0036.

U.S. EPA, 2009. Reregistration Eligibility Decision (RED) for Permethrin. U.S. Environmental Protection Agency, Prevention, Pesticides and Toxic Substances, EPA 738-R-06-017.

Wang D, Kamijima M, Imai R, Suzuki T, Kameda Y, Asai K, Okamura A, Naito H, Ueyama J, Saito I, Nakajima T, Goto M, Shibata E, Kondo T, Takagi K, Takagi K et Wakusawa S (2007). Biological monitoring of pyrethroid exposure of pest control workers in Japan. *J. Occup. Health* 49(6): 509-14.

Woollen BH, Marsh JR, Laird WJD, Lesser JE, 1992. The metabolism of Cypermethrin in man: differences in urinary metabolite profiles following oral and dermal administration. *Xenobiotica*, 22: 983-991.

## Captions to figures

Figure 1. Mean time courses ( $\pm$ SD) of *trans*-DCCA, *cis*-DCCA and 3-PBA in plasma (A) and urine (B) of volunteers following a single oral administration of 0.1 mg kg<sup>-1</sup> bw of cypermethrin (*trans/cis*: 58:42) (n = 6). Symbols represent mean values and vertical bars are standard deviations. Values for *cis*-DCCA were below the LOD after 24 h post-dosing.

Figure 2. Mean time courses ( $\pm$ SD) of *trans*-DCCA, *cis*-DCCA and 3-PBA cumulative excretion (as a molar % of administered dose) in the urine of volunteers following a single oral administration of 0.1 mg kg<sup>-1</sup> bw of cypermethrin (*trans/cis*: 58:42) (n=6). Values for *trans*-DCCA and *cis*-DCCA are expressed as a percentage of administered *trans*-cypermethrin and *cis*-cypermethrin, respectively. Symbols represent mean values and vertical bars are standard deviations.

**Table 1. Mean time to peak levels, first-order apparent absorption and elimination half-lives and excretion fraction ( $\pm$ SD) derived from individual times courses of *trans*-DCCA, *cis*-DCCA and 3-PBA in plasma and urine of volunteers following ingestion of 0.1 mg kg<sup>-1</sup> bw of cypermethrin (*trans/cis*: 58:42) (n = 6).**

	Mean $\pm$ SD <sup>a</sup> (n = 6)					
	<i>trans</i> -DCCA		<i>cis</i> -DCCA		3-PBA	
	<i>Plasma</i>	<i>Urine</i>	<i>Plasma</i>	<i>Urine</i>	<i>Plasma</i>	<i>Urine</i>
<b>Time-to-peak levels (h)</b>	5.0 $\pm$ 3.5	7.8 $\pm$ 5.9	7.0 $\pm$ 8.6	8.8 $\pm$ 5.7	7.7 $\pm$ 8.7	9.3 $\pm$ 5.7
<b>Apparent absorption half-life (h)</b>	3.7 $\pm$ 2.3	3.0 $\pm$ 2.6	3.2 $\pm$ 2.4	3.1 $\pm$ 2.3	4.2 $\pm$ 3.1	3.7 $\pm$ 2.6
<b>Apparent elimination half-life (h)</b>	5.1 $\pm$ 2.5	6.3 $\pm$ 0.3	6.9 $\pm$ 8.1	6.4 $\pm$ 1.6	9.2 $\pm$ 6.9	6.4 $\pm$ 0.7
<b>Excreted fraction (molar % of total dose)<sup>b</sup></b>		25.4 $\pm$ 8.8		11.0 $\pm$ 5.2		27.2 $\pm$ 17.2
<b>Excreted fraction (molar % of isomer dose)<sup>c</sup></b>		43.9 $\pm$ 15.2		26.2 $\pm$ 12.3		27.2 $\pm$ 17.2

<sup>a</sup> Represents mean  $\pm$  SD values of kinetic parameters derived from individual time course data.

Represents the molar percentage of total administered dose of cypermethrin (*trans/cis*: 58:42) recovered in urine as either *trans*-DCCA, *cis*-DCCA and 3-PBA.

<sup>b</sup> Represents the molar percentage of administered *trans*-cypermethrin recovered in urine as *trans*-DCCA and of *cis*-cypermethrin excreted in urine as *cis*-DCCA.

**Table 2. Toxicokinetic parameters calculated from the plasma concentration-time profiles of *trans*-DCCA, *cis*-DCCA and 3-PBA in volunteers following ingestion of 0.1 mg kg<sup>-1</sup> bw of cypermethrin (*trans/cis*: 58:42) (n = 6).**

Toxicokinetic parameters				Mean ± SD (n = 6)		
				<i>trans</i> -DCCA	<i>cis</i> -DCCA	3-PBA
AUC			66.6 ± 21.6	23.5 ± 28.8	174.6 ± 43.1	
[(nmol x h l <sup>-1</sup> ) kg <sup>-1</sup> ]						
AUMC			645.3 ± 118.0	116.5 ± 55.4	2195.4 ± 764.7	
[(nmol x h <sup>2</sup> l <sup>-1</sup> ) kg <sup>-1</sup> ]						
MRT			11.02 ± 5.12	10.44 ± 5.27	13.20 ± 5.80	
(h)						
CL	Upper estimate <sup>a</sup>	bound	2.40 ± 1.17	10.86 ± 9.16	1.46 ± 0.42	
	Lower estimate <sup>b</sup>	bound	1.01 ± 0.40	2.60 ± 1.67	0.38 ± 0.24	
V <sub>d</sub>	Upper estimate <sup>a</sup>	bound	20.68 ± 23.26	195.67 ± 389.39	22.72 ± 26.26	
	Lower estimate <sup>b</sup>	bound	7.93 ± 6.63	36.86 ± 65.07	4.55 ± 2.84	
(l)						

<sup>a</sup> Upper bound estimates of clearance (CL) and volume of distribution (V<sub>d</sub>) of the metabolites in plasma were calculated considering that the absorbed dose is equal to the exposure dose (*i.e.*, absorption fraction of 1).

<sup>b</sup> Lower bound estimates of clearance (CL) and volume of distribution (V<sub>d</sub>) of the metabolites in plasma were calculated considering that the absorbed dose corresponds to total amounts recovered in urine.

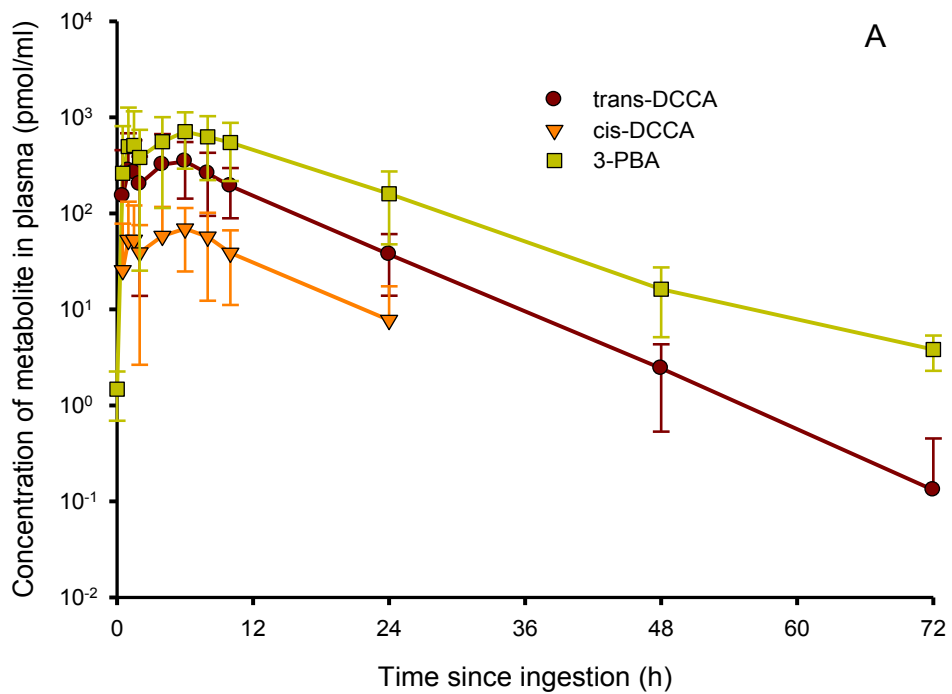


**Table 3. Time courses of *cis*-DCCA, *trans*-DCCA and 3-PBA excretion ( $\mu\text{mol/mol creat.}$ ) in the urine of volunteers following ingestion of  $0.1 \text{ mg kg}^{-1}$  of *trans*-/*cis*-cypermethrin (58:42) compared with kinetic data of Ratelle et al. (2014) following permethrin dosing (60:40) (n=6 per group).**

Mid-time points post ingestion (h)	Mean excretion of metabolites $\pm$ SD ( $\mu\text{mol/mol creat.}$ )					
	<i>trans</i> -DCCA		<i>cis</i> -DCCA		3-PBA	
	Permethrin dose	Cypermethrin dose	Permethrin dose	Cypermethrin dose	Permethrin dose	Cypermethrin dose
<b>0</b>	0.07 $\pm$ 0.16	0.55 $\pm$ 0.56	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	0.74 $\pm$ 0.58	0.60 $\pm$ 0.41
<b>1.5</b>	193 $\pm$ 166	198 $\pm$ 312	102 $\pm$ 100	124 $\pm$ 231	561 $\pm$ 962	181 $\pm$ 270
<b>4.5</b>	558 $\pm$ 499	409 $\pm$ 384	281 $\pm$ 272	198 $\pm$ 222	679 $\pm$ 732	265 $\pm$ 193
<b>7.5</b>	52.7 $\pm$ 280	386 $\pm$ 213	208 $\pm$ 110	169 $\pm$ 86.0	880 $\pm$ 562	277 $\pm$ 204
<b>10.5</b>	359 $\pm$ 191	303 $\pm$ 224	123 $\pm$ 67.6	110 $\pm$ 74.8	984 $\pm$ 167	268 $\pm$ 154
<b>18</b>	193 $\pm$ 91.5	291 $\pm$ 185	61.8 $\pm$ 40.2	114 $\pm$ 99.9	426 $\pm$ 170	319 $\pm$ 155
<b>30</b>	41.4 $\pm$ 54.8	48.0 $\pm$ 37.4	18.5 $\pm$ 27.0	17.6 $\pm$ 12.6	37.3 $\pm$ 18.2	74.0 $\pm$ 112
<b>42</b>	10.2 $\pm$ 7.92	11.6 $\pm$ 6.33	5.09 $\pm$ 5.12	4.54 $\pm$ 4.08	27.8 $\pm$ 14.0	33.1 $\pm$ 26.4
<b>54</b>	2.32 $\pm$ 1.95	3.31 $\pm$ 1.72	0.94 $\pm$ 1.38	1.92 $\pm$ 1.52	6.45 $\pm$ 3.62	7.40 $\pm$ 8.28
<b>66</b>	1.36 $\pm$ 1.03	1.72 $\pm$ 1.47	ND <sup>a</sup>	0.72 $\pm$ 1.22	2.92 $\pm$ 0.89	2.46 $\pm$ 1.36
<b>78</b>	0.72 $\pm$ 1.14	1.23 $\pm$ 1.41	ND <sup>a</sup>	0.49 $\pm$ 0.78	0.69 $\pm$ 0.49	1.45 $\pm$ 1.52

<sup>a</sup> ND = non detected (below LOD).

Fig 1.



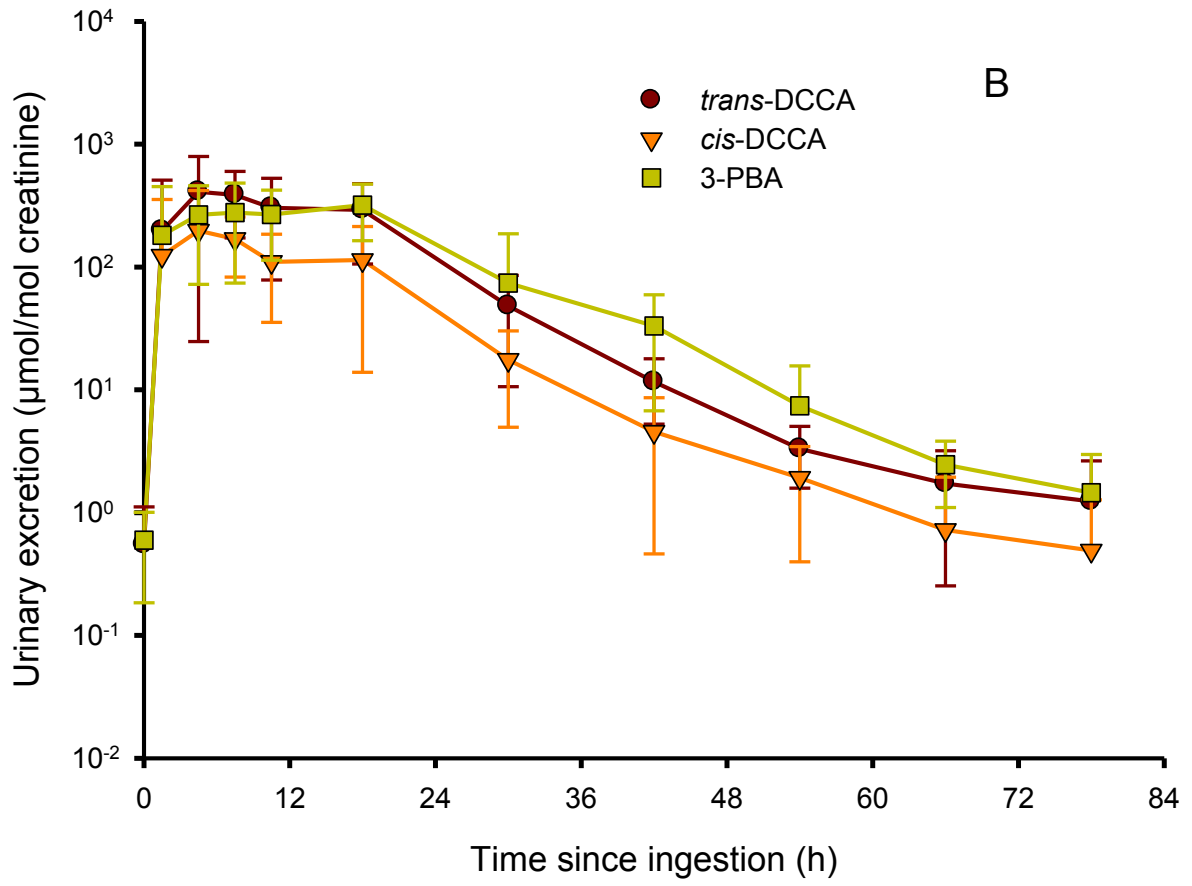
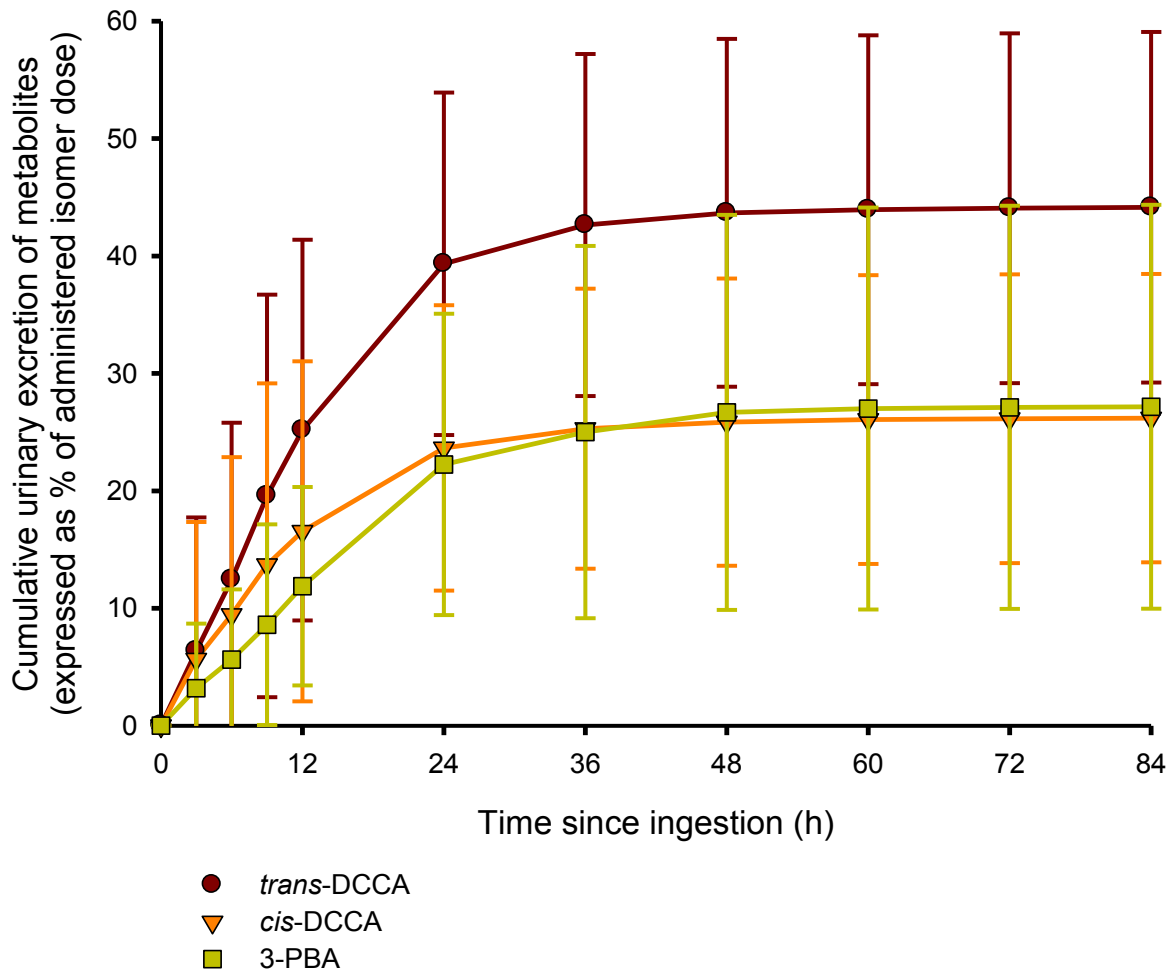


Fig 2.







## Chapitre 5

Article 3: Time courses and variability of pyrethroid biomarkers of exposure in a group of agricultural workers in Quebec, Canada

---





# Time courses and variability of pyrethroid biomarkers of exposure in a group of agricultural workers in Quebec, Canada

## Abstract

*Purpose* Cypermethrin is a pyrethroid pesticide widely used in agriculture. Exposure can be assessed through biomonitoring. However, interpretation of results requires a proper knowledge of the toxicokinetics of the exposure biomarkers of interest. This study aimed at characterizing typical urinary time courses of biomarkers of exposure to cypermethrin in farm workers in Quebec following an exposure episode, distribution of values and variability, and predictors of elevated excretion levels. *Methods* Workers provided total voids before seasonal spraying and during 3-consecutive days following an exposure period. Personal factors, professional tasks and exposure conditions were documented by questionnaire. Urinary metabolites (3-PBA; *cis/trans*-DCCA) were quantified. *Results* Time courses showed significant variations of metabolite levels through time. Maximum urinary levels in most exposed workers were generally reached 18 to 32 h following the onset of an exposure episode. Applicators showed higher excretions than workers performing inspection, harvest or weeding. *Conclusions* Results indicate the importance of serial urinary collections for a proper interpretation of a worker exposure pattern. In the context of group comparison, the alternative based on observed time courses and peak levels in most exposed workers would be the collection of urine samples prior to an exposure episode, at the end-of-shift after exposure onset and following morning void.

**Keywords:** Pyrethroids, cypermethrin, toxicokinetics, occupational health, DCCA, 3-PBA

# 1. Introduction

Agriculture is an important sector in Quebec, Canada. There are nearly 60,000 workers in agriculture (MAPAQ 2010). Application of insecticides on crops has been shown to limit ravages caused by insect pests, and increase agricultural productivity (Aktar *et al.* 2009). Currently, pyrethroids are the class of insecticides mostly used worldwide (Housset *et al.* 2009). Over 70% of Americans are suspected of being exposed to such pesticides (Barr *et al.* 2007). In Quebec, the latest published assessment of pesticide sales classifies pyrethroids at the forefront of insecticide sales (MDDEP 2012; Gorse and Balg 2013). Among those, cypermethrin is one of the mostly used pyrethroids.

However, these chemical compounds may cause adverse effects on the environment and on human health. Pyrethroids may cause effects on the central and peripheral nervous systems, due to a prolonged opening of sodium channels (Kühn *et al.* 1999). Some studies also reported immune and endocrine disorders associated with mid or long-term exposure to these compounds in humans (Hadnagy *et al.* 2003; Zhao *et al.* 2010).

Pyrethroid residues have been quantified in the diet, such as fruits and vegetables, explaining in large part the baseline levels of metabolites observed in the urine of the general population (Health Canada 2013; NHANES 2003, 2009; Barr *et al.* 2010). In farm workers, exposure may occur by inhalation during pesticide handling and spraying or by dermal contact following field inspection, harvest or weeding. Vermeulen *et al.* (2002) estimated the relative contribution of the different exposure routes for workers to be 10 and 90% by inhalation and dermal contact, respectively. Lafortune and Panisset (1988) also found that only 42-60% of agricultural workers were safely handling pesticides, indicating the importance of monitoring exposure in the workplace. Exposure was reported to increase significantly when pesticides were used in closed environments (Bradberry *et al.* 2005). However, the extent of dermal exposure is difficult to assess. The exposed surface, the duration and frequency of exposure are difficult to measure. Fenske (1988; 1990) estimated that the exposed body surface of farmers was between 4 and 22%. This estimate depends on the type of activity or clothing

protection. To obtain an integrated assessment of exposure to pesticides by the different routes-of-entry in workers, biomonitoring of metabolites in urine has been proven as a useful tool (National Research Council, NHANES 2006). Pyrethroids are metabolized primarily in the liver by carboxylesterases or cytochrome P450. The first step in the metabolism is the hydrolysis of the ester group and this is followed by different oxidation steps (Soderlund *et al.* 2002). Metabolites are conjugated and excreted mainly in the urine within a few days (Kühn *et al.* 1999). The main urinary metabolites of cypermethrin are *cis*- and *trans*-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane-1-carboxylic acids (DCCA) and 3-phenoxybenzoic acid (3-PBA).

There is no published data on the biological monitoring of exposure to pyrethroids in agricultural workers in Quebec. The main published biomonitoring studies of these pesticides in workers have been conducted in Japan, Thailand, Germany, United States and France (Arcury *et al.* 2006; Hardt and Angerer 2003; Leng *et al.* 1996; LeGrand *et al.* 2012; Panuwet *et al.* 2008; Wang *et al.* 2007). Some of these studies have shown significant absorption of pyrethroids due to occupational exposures. Biological monitoring was obtained primarily from spot measurements (one collection) or 24 h collections. However, the use of spot urine samples in the evaluation of exposure to non-persistent pesticides has been questioned (Arcury *et al.* 2006; Barr *et al.* 2007). Urinary levels may vary significantly during the course of a work day or a work-week and according to the exposure route and scenario (Berthet *et al.* 2012). When feasible, the use of repeated biological measurements in exposed workers is recommended for a better assessment of absorbed doses, time-to-peak levels, main route-of-entry. Personal, work or task related factors that may also have an impact on the observed biological levels. Information on the time courses should then set the basis for the assessment of best sampling strategies for routine monitoring and proper interpretation of biomonitoring data.

The aim of this study was to obtain information on: i) typical urinary time courses of biomarkers of exposure to cypermethrin under normal exposure conditions in farm workers of Quebec, Canada, following different work tasks; ii) the extent of exposure in this group, distribution of values and variability; iii) factors that may have an impact on the observed

biological levels. Documenting the time course also aimed at obtaining data to assess appropriate sampling strategies for routine monitoring (limited repeated urinary measurements).

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Studied workers**

Agricultural workers exposed to Ripcord 400 formulation containing cypermethrin were recruited from three farms (with 10 to 100 workers) located in the Montérégie, a vast agricultural rural region of the Province of Quebec dedicated in large part to the production of vegetables, small fruits, fruit trees, and cereals. Individuals enrolled were assigned to different tasks, such as the preparation and application of cypermethrin or subsequent work in treated crops. Workers of different ethnic origins were included and there were no specific inclusion criteria with regard to smoking status, age, gender, socio-economic status or health status. Workers were all assessed under their normal exposure conditions.

The Health Research Ethics Committee of the University of Montreal approved the protocol, questionnaire and consent forms (certificate 12033-CERES-D). All workers were recruited on a voluntary basis and gave their written informed consent to participate in the study. They were also informed of their right to withdraw from the study at all times. The volunteers received a small monetary compensation for their time and any inconvenience caused.

### **2.2. Urine sample collection**

Serial urine sample collections were conducted following two different types of exposure, namely spraying activities (including preparing, mixing and loading tasks) and weeding/harvest activities after the required re-entry delay. Sampling was conducted during the seasonal period presumed to be associated with worst exposure scenarios. Recruited individuals were asked to provide i) a pre-seasonal total first-morning void, in order to establish baseline levels of exposure along with ii) total urine voids prior to and during a typical 3-day period following a cypermethrin-formulation spraying or a work in a recently treated field.

Each void was collected in separate 1L polypropylene Nalgene<sup>®</sup> bottles containing thymol to reduce bacterial growth. Samples were kept in coolers with ice packs or in a refrigerator on site and were transported within a few hours by our team to the laboratory of the University of Montreal. Once at the laboratory, urine volume was measured and aliquots (three tubes of 15 ml and 2 bottles of 120 ml) were frozen at -20°C until analysis.

### 2.3. Treatment of urine samples and laboratory analysis

#### 2.3.1. Chemicals and reagents

Reference standards of *cis*- and *trans*-DCCA (molecular weight: 209.07 g/mol) and 3-PBA (molecular weight: 214.22 g/mol) and the internal standards <sup>13</sup>C<sub>2</sub> 1D -*trans*-DCCA and <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-3-PBA (>99% purity) were purchased from Cambridge Isotope Laboratories Inc. (Andover, MA, USA). LC-MS optima grade methanol and HPLC grade acetic acid were obtained from Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada). β-Glucuronidase/arylsulfatase enzyme (100000 Fishman U ml<sup>-1</sup> and 800000 Roy U ml<sup>-1</sup> from *Helix pomatia*) was obtained from Roche Diagnostics (Laval, Quebec, Canada).

#### 2.3.2. Working standard 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 and 1 nmol/ml 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 of methanolic extract for *trans*-DCCA and 3-PBA and 0, 7, 14, 29, 57, 100 and 143 pmol/ml for *cis*-DCCA. The internal standard concentration was set at 200 pmol/ml of methanolic extract. The stability of standards in methanol kept at -20°C was of about one month and the stability in urine kept at -20°C was of more than 3 months.

### 2.3.3. 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. Five ml of acetate buffer (0.1 M) were added and urine samples were subjected to 16 h over-night 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 30 s at 3400 rpm and transferred to vials for analysis. These metabolites were analyzed by ultra-high performance liquid chromatography coupled to quadripole/time-of-flight mass-spectrometry (UHPLC-MS Q/ToF).

### 2.3.4. UHPLC-MS Q/TOF 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-LC Ultra High Performance Liquid Chromatography system (UHPLC) 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 tandem mass spectrometer (Agilent, Mississauga, Canada) equipped with a Jet-Stream Electrospray Ionization (AJS ESI) source. The source was operated in the negative ion mode and the specific ESI- -MS parameters were all manually optimized.

The compounds were separated using a C<sub>18</sub> Zorbax Eclipse Plus column (2.1x50 mm; 1.8 µm, HD) from Agilent (Mississauga, Canada). The temperature of the column was maintained at 35°C. The mobile phase consisted of: eluent A composed of water and 0.1% acetic acid, and eluent B of methanol and 0.1% acetic acid. For analysis, elution was performed in 11 min

using a solvent gradient, at a flow rate of 0.5 mL/min. 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 from the column between 6 to 6.8 minutes. The samples were kept at 5°C on the injection tray and 5 µL were injected in the column.

The exact masses of the analytes were determined in MS mode using the following ToF conditions: sheath gas (N<sub>2</sub>) temperature at 340°C and gas flow rate of 10 l/min; nebulizer gas pressure of 50 psi; drying gas temperature (N<sub>2</sub>) at 365°C and flow rate of 12 l/min; capillary voltage (V<sub>cap</sub>) at 3000 V, nozzle voltage at 0 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 <sup>13</sup>C<sub>2</sub> 1D *trans*-DCCA and 219.07585 for <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-3-PBA. The A+2 isotope mass of Cl was used for <sup>13</sup>C<sub>2</sub> 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 depending on the analyte. The response factors corresponded to the peak-area ratios of each compound ion to the internal standard ion. The limit of detection (LOD) for *trans*-DCCA, *cis*-DCCA and 3-PBA was 18, 14 and 31 injected fmol, respectively, or 0.1-0.3 µg/l of urine (equal to 3 standard deviations of response 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 or positive controls) ranged between 1.5 and 4.1%.

### 2.3.5. Creatinine correction

Urinary levels were either expressed in creatinine-corrected concentrations (µmol/mol



creatinine) or in excretion rates (pmol/h/kg of body weight). Creatinine was measured in urine by the Jaffé method, an alkaline picric acid method with deproteinization (enzymatic colorimetric test PAP from Boehringer Mannheim, Germany).

## 2.4. Questionnaire

Workers were asked to fill a self-administered questionnaire in their mother tongue to assess factors that may have an impact on the observed biological levels (Table 1). The questionnaire was filled pre-season as well as daily during the three day collection period. Personal information was collected (sex, age, ethnic origin, highest educational level, general health status) along with information on life-habits (physical activities, domestic use of pesticide containing products from a pre-established list, smoking habits or exposure to secondary smoke, alcohol consumption, medication, intake of food that may contain pesticide residues). Work related questions were also included: working hours, time spent in a treated area or preparing/mixing/loading/spraying period, decontamination of the material, pesticides used on the field during the study period, personal protective equipment, and personal hygiene after possible contact or working hours (shower, washing, change/handling of work clothing).

## 2.5. Data analysis of the time course of exposure biomarkers

### 2.5.1. Analysis of the time courses of exposure biomarkers for each worker

The time courses of *trans*-DCCA, *cis*-DCCA and 3-PBA were assessed in the urine of workers and expressed as concentrations or excretion rates per unit of time. Based on the repeated measurements, distribution of values of the different metabolites in the urine of a same individual was established and recorded as geometric mean (GM), minimum, 5<sup>th</sup> percentile, median, 95<sup>th</sup> percentile and maximum. These values were compared to corresponding urinary levels observed in the general Canadian population, aged 6 to 79 years, as part of the Canadian Health Measures Survey (CHMS 2013).

### 2.5.2. Statistical analysis of determinants of urinary biomarker levels among workers considering repeated biological measurements

Linear mixed effects models (linear mixed effect models (MIXM)) were used to assess the determinants of observed urinary levels of biomarkers of exposure (*trans*-DCCA, *cis*-DCCA and 3-PBA) and within and between-subject variance of each biomarker, considering the subject variable as a random effect and a presumed compound symmetry covariance structure among repeated measurements. Ordinal variables were treated continuously. Since the assumption of homogeneity and normality was not met after residual analysis, levels of biomarkers of exposure and age were expressed in log-transformed values to obtain a near normal distribution with constant variance. Levels of 3-PBA in terms of concentration ( $\mu\text{mol/mol creat.}$ ) or excretion rate ( $\text{pmol/h/kg bw}$ ) were considered as the dependent variable in the models. The urinary metabolites, *trans*-DCCA and *cis*-DCCA, with lower detection rates, were not considered in the statistical analyses.

Potential confounding variables considered in the models were age (log transformed continuous variable in years), body mass index (BMI continuous), sex (male/ female), smoking (yes/ no), alcohol consumption (yes/ no during the study period), education (primary or secondary/ college or university), ethnicity (Caucasian/ Latin origin), fruits, vegetables and cereals (mean daily portions over three days according to Canada's Food Guide; considered as a discrete continuous variable). Furthermore, the following potential determinants of biological levels were considered: 1) the size of the farm (< or > 50 employees); 2) the task performed (inspection/ weeding/harvesting or spaying including preparation and mixing); 3) exposure duration (continuous).

Associations between potential confounding factors or potential determinants of exposure and biomarkers of exposure were first evaluated in univariate models (explanatory variables introduced one by one in the models). Multivariate models were then constructed by first inserting all variables and then sequentially subtracting those that did not contribute to the model according to the Akaike information criterion (AIC) (according to the approach proposed by Zuur *et al.* 2009). Only predictors and confounders contributing to the data fit of

the multivariate models were retained in the final models. Statistical analyses were performed using SPSS 21.0 Software (SPSS, Inc., Chicago). The level of statistical significance for the final multivariate models was set at  $p \leq 0.05$ .

To statistically identify workers with high biomarker profiles, the SPSS *classification* analysis was used. The algorithm classifies data in two clusters by choosing proxies (geometric mean and 95<sup>th</sup> percentile value) to obtain the highest difference between these two clusters and identify a group of workers with baseline levels and a group of workers with a profile. Statistical analyses were performed using SPSS Plus 21.0 software (SPSS, Inc., Chicago). The statistical significance level for the multivariate analysis was set at  $p \leq 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Characteristics of the subjects and exposure conditions to cypermethrin

The project was presented to 40 workers. From that number, 34 accepted to participate in the study and provided pre-exposure urine samples, but only 26 of those workers were subsequently exposed to cypermethrin following application or work in a treated area. Eight of the workers were exposed twice to cypermethrin during the season. Therefore, a total of 34 exposure profiles were obtained. Table 2 shows the main personal characteristics of the workers for the 26 workers who provided post-exposure samples. Only 15% were female; 73% were of Hispanic origin; the median and mean age was 37 years old and education level was low. Less than 8% smoked during sampling period or took medications or alcohol that could interfere with cypermethrin urinary elimination. Consumption of fruits, vegetables and cereals was low, with reported daily median portions of 2, with reference to the Canadian food guide (Health Canada 2011). None of the participants reported signs or symptoms that may be associated with exposure to this type of pesticide.

Information on worker exposure conditions during the three-day study period is presented in Table 3. Workers were recruited from 3 different farms in the Montérégie region of Quebec. For all field spraying, a tractor with a cabin was used. The exposure duration to cypermethrin in the 5 recruited applicators ranged between 30 min and 95 min while the other individuals, who performed tasks such as inspections, weeding or harvesting were exposed to cypermethrin in general only on the first day of the 3-day study period with work-day shifts in the field area treated with cypermethrin of 6.4 h on average (range of 1-10 h). All workers wore boots, long-sleeved shirts and pants. Applicators also wore gloves and a mask (except 1 applicator who just wore gloves) but no such protection was used by workers performing weeding, harvesting or inspection.

### 3.2. Time profiles of *trans*-DCCA, *cis*-DCCA and 3-PBA in the urine of exposed workers

The time courses of *trans*-DCCA, *cis*-DCCA and 3-PBA were established in 26 workers, 8 of which provided two serial urinary measurements following different tasks. 3-PBA was the metabolite found in highest concentrations in the urine of the assessed workers, followed by *trans*-DCCA and to a much lesser extent *cis*-DCCA. Observed intra- and inter-subject variability in biomarker excretion is depicted in Tables 4 and 5 for 3-PBA and *trans*-DCCA (data not shown for *cis*-DCCA given their lower detection rate). Results show that excretion values were quiet variable for the same subject, with reference to the 95<sup>th</sup> to 5<sup>th</sup> percentile ratio for 3-PBA (considering only 5<sup>th</sup> percentile values higher than the LOD): 3 to 123 for creatinine-corrected concentrations ( $\mu\text{mol/mol}$  of creatinine) and 11 to 2076 for excretion rate values (in  $\text{pmol/h/kg}$  bw). Between-subject ratio of 95<sup>th</sup> percentile values reached 69 for creatinine-corrected concentrations and 70 for excretion rates. Within-subject variability for several workers was thus higher than between-subject variability.

Excretion values of 3-PBA in workers (expressed in  $\mu\text{mol/mol}$  creat.) were compared with distribution of values observed in the latest biological follow up of the Canadian population, conducted as part of the Canadian Health Measures Survey (CHMS 2013) (Table 4). Of the 34 observed excretion profiles in workers, 16 profiles showed geometric mean concentrations of 3-PBA above the geometric mean reported for the Canadian population (CHMS 2013) but only 5 profiles showed 95<sup>th</sup> percentile values of 3-PBA above the 95<sup>th</sup> percentile value observed in the Canadian population. For *trans*-DCCA, only one profile showed 95<sup>th</sup> percentile values higher than the 95<sup>th</sup> percentile of 3.0  $\mu\text{g/g}$  creatinine (or 1.62  $\mu\text{mol/mol}$  creat.) obtained in the CHMS. No geometric mean value for *trans*-DCCA was higher than the geometric mean of 0.25  $\mu\text{g/g}$  creatinine (or 0.135  $\mu\text{mol/mol}$  creat.) reported in the CHMS (Tables 4 and 5).

When looking at the overall excretion time courses of 3-PBA over the 3-day collection period in workers, 4 profiles were statistically identified as showing high concentrations (figure 1), when comparing geometric mean and 95<sup>th</sup> percentile values between workers (expressed in

pmol/h/kg and  $\mu\text{mol/mol}$  of creatinine). Figure 1 shows the observed time courses of 3-PBA and *trans*-DCCA excretion in the urine of the most highly exposed workers. Time courses of the two biomarkers of exposure generally evolved in parallel, exception for the worker T13 who performed weeding.

### 3.3. Statistical assessment of predictors of elevated biomarkers of exposure between workers

Table 6 presents personal factors and exposure variables documented by questionnaire showing an association with *trans*-DCCA and 3-PBA excretion values according to MIXM univariate analysis (explanatory variables assessed individually in the model). Results for *trans*- and *cis*--DCCA were not considered due to the small number of samples with values above the limit of detection (33.7 and 1.7%, respectively). When taken into account individually in the MIXM model, professional task, farm size, exposure duration, body mass index (BMI), ethnicity, and consumption of fruits, vegetables and cereals, showed a statistically significant association with biomarker data for at least one unit (Table 6).

Table 6 also presents results of the MIXM multivariate analysis of predictors of biological levels of 3-PBA excretions in workers ( $\mu\text{mol/mol}$  creatinine or pmol/h/kg bw) and potential confounders, considering repeated biological measurements. In the final MIXM multivariate model, there was a significant within-subject variability in repeated biological measurements ( $p < 0.001$ ). Four variables were considered to contribute to multivariate model fit to data, according to Akaike information criterion (AIC): age, farm size, professional task and education level. In the final multivariate model, professional task was the main predictor of observed biological levels and none of the other variables were significantly associated with 3-PBA levels.

## 4. Discussion

### 4.1. Time courses of *trans*-DCCA, *cis*-DCCA and 3-PBA in the urine of exposed workers

The current study provided time course data in workers exposed to pyrethroids following different tasks. Given that pyrethroid metabolites have short elimination half-lives, each urine void collected following an exposure period is important to characterize this exposure. Results of the current study show that, for the majority of worker profiles, there was no distinct time course patterns with a progressive increase in excretion values following the onset of an exposure period followed by a time-dependent exponential elimination with time-to-peak levels indicative of a specific exposure route, such as those observed under controlled exposure conditions (Woollen *et al.* 1992; Ratelle *et al.* 2014). Only 4 worker profiles (12%) showed time courses indicative of significant cypermethrin absorption. Maximum excretion levels for 3 of these 4 profiles were observed 18 to 32 h following the onset of an exposure period. The fourth profile showed a maximum excretion at about 3.5 days (82 h) following onset of an application, suggesting delayed contact with contaminated material used for spraying a few days before or an exposure in the field following screening.

Time courses showed that 3-PBA concentrations were somewhat higher than those of *trans*-DCCA for several workers and in particular the most highly exposed. In volunteers exposed orally to cypermethrin under controlled conditions (Woollen *et al.* 1992; Ratelle *et al.* 2014), *trans*-DCCA concentrations were similar to those of 3-PBA. This suggests concomitant exposure to other pyrethroids generating 3-PBA metabolites in workers, since 3-PBA is a metabolite common to several pyrethroids, including lambda-cyhalothrin and deltamethrin, which are used in vegetable farms, while *trans*-DCCA is common only to permethrin and cypermethrin (Barr *et al.* 2010). However, according to the available information, lambda-cyhalothrin and deltamethrin were not applied before or during the study period in the fields

treated with cypermethrin. 3-PBA generating pyrethroids may however have been used in other adjacent farms or the observed levels may result from another unidentified source.

#### **4.2. Within-subject variability in repeated biological measurements**

Time course results in workers also showed a wide within-subject variability in excretion values over the course of a 3-workday following the onset of an exposure period. This is similar to population biomonitoring results observed in other studies for different environmental contaminants (Fromme *et al.* 2007; Meeker *et al.* 2005; Whyatt *et al.* 2009). In line with our results, they reported a within-subject variability higher than between-subject variability (Whyatt *et al.* 2009), or at least a wide variability up to 200 times was noted (Fromme *et al.* 2007; Meeker *et al.* 2005).

Our results also show that within-subject variability in creatinine-corrected concentrations was lower than that of excretion rate values adjusted for worker body weight. However, the time profiles observed in the mostly highly exposed subjects were similar when expressing results in terms of creatinine-corrected concentrations or excretion rates adjusted for the body weight (Figure 1). This indicates that both units provide similar information on the toxicokinetics, but also suggests that creatinine-correction may tend to reduce physiological time-dependent variability in a same individual. Creatinine standardization has been proven necessary to express time-dependent variations in the renal excretion of xenobiotics eliminated by glomerular filtration and active tubular secretion and with limited reabsorption (Boeniger *et al.* 1993; Viau *et al.* 2004). Adjustment for creatinine has also been shown to be an adequate standardization for inter-individual comparison, limiting the biological impact of water intake and loss, food intake and circadian variation on excretion values (Boeniger *et al.* 1993).

Time courses of metabolites in the group of workers assessed in the present study showed that between-subject variability was smaller than within-subject variations in some workers. This has also been reported in other studies (Fromme *et al.* 2007).



### 4.3. Statistical analysis of predictors of elevated biomarkers of exposure between workers

The study also allowed identifying predictors or factors that were associated with pyrethroid metabolite excretion time courses in the studied workers. Even if some personal or work-related characteristics were individually associated with metabolite excretion, in the multivariate linear mixed-effects model, only the main professional task was consistently associated with exposure biomarker levels (pesticide applicators vs other workers). Pesticide applicators had statistically higher biological values than workers performing tasks such as weeding, harvesting or inspection of fields. Other studies on pesticides have reported similar task related trend in values (Baldi *et al.* 2006; Berthet *et al.* 2012; Dalvie *et al.* 2009). In a study performed in the general population, personal or life-habit factors such as drug consumption or smoking were associated with urinary excretion rate of pyrethroid metabolites (Fortin *et al.* 2008). In the current study, only a small number of workers reported smoking or taking medication. It has also previously been reported that the excretion rate of 3-PBA in individuals from the general US population was significantly associated with ethnicity, age and time of collection considered concomitantly in a statistical multivariate model (Barr *et al.* 2010). However, no work-related exposure variable was assessed in the latter study. Ethnicity and age did not contribute significantly to pyrethroid metabolite excretion in workers of our study, according to the multivariate mixed-effect models, and this may be explained by the small sample size comprised mostly of Hispanic workers and health conditions of workers. It has further been demonstrated that consumption of alcohol can alter the metabolism of some chemical compounds by interfering with enzyme activity (Choi *et al.* 2002; Gueguen *et al.* 2006); alcohol consumption was not associated with pyrethroid metabolite excretion in our study.

#### 4.4. Comparison of excretion values in workers biological reference values from other studies

In addition to providing time course data to assess within and between-subject variability, this study also allowed to obtain information on the extent of exposure to cypermethrin in vegetable farm workers. When comparing metabolite concentrations in workers with biological reference values observed in the Canadian Health Measures survey for the general population (CHMS 2013), two workers showed maximum values of *trans*-DCCA exceeding the upper bound estimate of values observed in the general population (95<sup>th</sup> percentile). Workers exposed to pesticide may however be included in the CHMS samples. Concentrations for workers in our study reached values much higher than maximum or 95<sup>th</sup> percentile values reported in studies conducted in the general population worldwide (Fortin *et al.* 2008; Couture *et al.* 2009; Leng *et al.* 2006; Le Grand *et al.* 2012).

Our worker data can also be compared to other biomonitoring data on *trans*-DCCA and 3-PBA in occupationally exposed workers. In those studies, spot measurements were conducted in most studies (Panuwet *et al.* 2008; Wang *et al.* 2007) or 24-h urine collection (Hardt and Angerer 2003). Some studies in Thailand farmers showed maximum concentration of DCCA or 3-PBA assessed either in spot urine samples up to 11-times higher than corresponding values observed in our studied workers (Panuwet *et al.* 2008; Thiphom *et al.* 2014). Occupational hygiene habits, protective equipments during spraying and climate (heat and humidity) are factors known to influence respiratory exposure and dermal absorption (Havenith 1999). Other studies in US, German or Japanese farmers, and in exterminators or greenhouse workers reported maximum values of 3-PBA in spot urine samples or 24-h urine collections in the same value range observed in our workers (Hardt and Angerer 2003; Wang *et al.* 2007).

Time course data in our study may further be compared to results obtained in a toxicokinetic study in volunteers exposed to the acute oral dose of 0.1 mg/kg of cypermethrin, corresponding to the RfD value established by the U.S. EPA, below which the risk of adverse

effects should be negligible (Ratelle *et al.* 2014). In the latter study, maximum excretion rate of 1144  $\mu\text{mol/mol}$  of creatinine were observed for *trans*-DCCA and 672  $\mu\text{mol/mol}$  of creatinine for 3-PBA, which is almost 100 times higher than time course values observed in the workers under study.

#### 4.5. Considerations for appropriate routine biomonitoring of workers exposure to cypermethrin and future perspectives

To fully assess exposure in a worker, this study showed the importance of measuring multiple metabolites of cypermethrin in urine, *trans*-DCCA and 3-PBA, and to perform repeated measurements in time. However, for routine biomonitoring in groups of workers, a more practical sampling strategy on the basis of observed time courses in the current study would be as follows: 1) a pre-exposure sample following a period of at least 48 h without exposure to pyrethroids to obtain baseline levels; 2) complete end-of-shift urine collection on the first exposure day; 3) complete first morning urine void on the subsequent day, on the basis of the observed maximum excretion rate 18 to 32 h following the onset of an exposure period. Results should also be expressed on the basis of creatinine-corrected concentrations, which appear less variable in a given individual than excretion rates. As the application is the task associated with the highest exposure, this population should first be targeted. Meeker *et al.* (2005) suggested collecting two samples within an interval of at least one month between each sampling to reduce within-subject variability for non-persistent insecticides. However, this period does not seem necessary according to our assessment, which reduces sampling period.

Overall, this work mainly focussed on documenting the time courses of cypermethrin metabolites in occupationally exposed individuals, and obtaining a comprehensive understanding of within and between-subject variability, while accounting for factors such as age, ethnicity, and work tasks. Although the number of recruited volunteers was relatively limited which increased between-subject variability, the study allowed to establish appropriate sampling strategies for future routine biomonitoring studies in a larger and more representative group of workers. The current study also highlighted challenges related to the non-specificity

of metabolites to a single pyrethroid, Low response rate to questions related to personal hygiene habits and low educational level having an impact on the quality of answers to questions. There was also potential urine loss, and lower sensitivity of the analytical for DCCA detection compared to 3-PBA, although the current study benefited from the most highly specific mass spectrometry detection method, which is necessary when considering the complex mixtures of chemical compounds in urinary matrices.

## **Conflicts of interest statement**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## **Acknowledgements**

The study was funded by the *Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et sécurité du travail du Québec* (IRSST). Mylène Ratelle received a Ph.D. scholarship from the Faculty of Medicine of the University of Montreal and the University of Montreal's Public Health Research Institute (IRSPUM).

## References

- Aktar W, Sengupta D, Chowdhury A (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards Interdisciplinary. *Toxicology* 2 (1): 1–12
- Arcury TA, Quandt SA, Barr DB, Hoppin JA, McCauley L, Grzywacz JF, Robson MG (2006). Farmworker exposure to pesticides: methodologic issues for the collection of comparable data. *Environ Health Perspect* 114(6): 923-928
- Baldi I, Lebailly P, Jean S, Rougetet L, Dulaurent S, Marquet P (2006). Pesticide contamination of workers in vineyards in France. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 16: 115–124
- Barr DB, Leng G, Berger-Preiss E, Hoppe HW, Weerasekera G, Gries W, Gerling S, Perez J, Smith K, Needham LL, Angerer J (2007). Cross validation of multiple methods for measuring pyrethroid and pyrethrum insecticide metabolites in human urine. *Anal Bioanal Chem* 389: 811-818
- Barr DB, Olsson AO, Wong L-Y, Udunka S, Baker SE, Whitehead RDJ, Magsumbol MS, Williams BL, Needham LL (2010). Urinary concentrations of metabolites of pyrethroid insecticides in the general US population: National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2002. *Environ Health Perspect* 118: 742-748
- 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 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

Bradberry SM, Cage SA, Proudfoot AT, Vale JA (2005). Poisoning due to Pyrethroids. *Toxicological Reviews* 24 (2): 93-106

Bradman A, Salvatore AL, Boeniger M, Castorina R, Snyder J, Barr DB, Jewell NP, Kavanagh-Baird G, Striley C, Eskenazi B (2008). Community-based intervention to reduce pesticide exposure to farmworkers and potential take-home exposure to their families. *J Expo Sci Environ Epidemiol* pp: 1-11

Choi J, Rose RL, Hodgson E (2002). In vitro human metabolism of permethrin: the role of human alcohol and aldehyde dehydrogenases. *Pest Biochem Physiol* 73: 117-128

Couture C, Fortin MC, Carrier G, Dumas P, Tremblay C, Bouchard M (2009). Assessment of exposure to pyrethroids and pyrethrins in a rural population of the Moneregie area, Quebec, Canada. *Occup Environ Hyg* 6: 341-352

Dalvie MA, Africa A, Solomons A, London L, Brouwer D, Kromhout H (2009). Pesticide exposure and blood endosulfan levels after first season spray amongst farm workers in the Western Cape, South Africa. *J Environ Sci Health (B): Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* 44 (3): 271-277

Fenske RA (1988). Comparative Assessment of Protective Clothing Performance by Measurement of Dermal Exposure during Pesticide Applications. *Applied Industrial hygiene* 3207- 3213

Fenske RA (1990). Nonuniform dermal deposition patterns during occupational exposure to pesticides. *Arch Environ Contam toxicol* 19:332-337.

Fortin MC, 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: 343-350

Fromme H, Bolte G, Koch HM, Angerer J, Boehmer F, Drexler H, Mayer R, Liebl B (2007). Occurrence and daily variation of phthalate metabolites in the urine of an adult population *Int J Hyg Environ Health* 210: 21–33

Gueguen Y, Mouzat K, Ferrari L, Tissandie E, Lobaccaro JMA, Batt A-M, Paquet F, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P, Souidi M (2006). Cytochromes P450: Xenobiotic metabolism, regulation and clinical importance. *Ann Biol Clin* 64 (6) : 535-548

Gorse I, Balg C (2013). Bilan des ventes de pesticides au Québec pour l'année 2010, Québec. Ministère du Développement durable, de l'Environnement, de la Faune et des Parcs, 85 p

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: 93-102

Hardt J, Angerer J (2003). Biological monitoring of workers after the application of insecticidal pyrethroids. *Int Arch Occup Environ Health* 76: 492-498

Havenith G (1999). Heat balance when wearing protective clothing. *Ann Occup Hyg* 43 (5): 289-296

Health Canada (2011). Food Guide. [http://wwwhc-scgccca/fn-an/alt\\_formats/hpfb-dgpsa/pdf/food-guide-aliment/print\\_eatwell\\_bienmang-engpdf](http://wwwhc-scgccca/fn-an/alt_formats/hpfb-dgpsa/pdf/food-guide-aliment/print_eatwell_bienmang-engpdf). Accessed 14 July 2014

Health Canada (2012). Maximum residue limit (MRL)- MRL Database. <http://wwwhc-scgccca/cps-spc/pest/part/protect-proteger/food-nourriture/mrl-lmr-engphp>. Accessed 14 July 2014

Health Canada (2013). Second report on human biomonitoring of environmental chemicals in Canada: Canadian Health Measures Survey (CHMS)-Cycle 2 (2009-2011). Government of Canada, 446 p



Housset P, Dickmann R (2009). A promise fulfilled – pyrethroid development and the benefits for agriculture and human health. *Bayer CropScience Journal* 62(2): 135-143

Kuhn K-H, Wieseler B, Leng G, Idel H (1999). Toxicokinetics of pyrethroid in humans: consequences for biological monitoring. *Bull Environ Contam Toxicol* 62: 101-108

Lafortune M, Panisset JC (1988). Mesure de risque d'exposition aux pesticides pour les producteurs agricoles du Québec. *Travail et santé* 4(2) :S9-S14

Le Grand R, Dulaurent S, Gaulier JM, Saint-Marcoux F, Moesch C, Lachâtre G (2012). Simultaneous determination of five synthetic pyrethroids metabolites in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry :application to 39 persons without know exposure to pyrethroids. *Toxicol Lett* 210 (2): 248-253

Leng G, Kühn KH, Idel H (1996). Biological monitoring of pyrethroid metabolites in urine of pest control operators. *Toxicol Lett* 88 (18): 215

Leng G, Gries W, Selim S (2006). Biomarker of pyrethrum exposure. *Toxicol Lett* 162: 195-201

MAPAQ- Ministère de l'agriculture, pêche et alimentation du Québec (2010). L'emploi bioalimentaire. <http://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/md/statistiques/Pages/emploi.aspx>. Accessed 23 may 2013

Meeker JD, Barr DB, Ryan L, Herrick RF, Bennett DH, Bravo R, Hauser R (2005). Temporal variability of urinary levels of nonpersistent insecticides in adult men. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 15: 271–281

MDDEP (2012). Bilan des ventes de pesticides au Québec pour l'année 2009, Québec, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, ISBN 978-2-550-64375-3, 85 p

NHANES (2003). Third national report on human exposure to environmental chemicals. National Health and Nutrition Examination Survey National Center for Health Statistics, Hyattsville, MD

NHANES (2009). Fourth national report on human exposure to environmental chemicals National Health and Nutrition Examination Survey, Atlanta (GA), 529 p

Panuwet P, Prapamontol T, Chantara S, Thavornyuuthikarm P, Montesano MA, Whitehead RDJ, Barr DB (2008). Concentrations of urinary pesticide metabolites in small-scale farmers in Chiang Mai province, Thailand. *Sci Total Environ* 407: 655-668

Ratelle M, Côté J, Bouchard M (2014). Systematic comparison of toxicokinetic parameters of cypermethrin and permethrin biomarkers of exposure in orally exposed volunteers. *J Appl Toxicol* (accepted)

Soderlund DM, Clark JM, Sheets LP, Mullin LS, Piccirillo VJ, Sargent D, Stevens JT, Weiner ML (2002). Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology* 171: 3–59

Thiphom S, Prapamontol T, Chantara S, Mangklabruks A, Suphavitai C, Ahn KC, Gee SJ, Hammock BD (2014). Determination of the pyrethroid insecticide metabolite 3-PBA in plasma and urine samples from farmer and consumer groups in northern Thailand. *J Environ Sci Health (B)* 49: 15-22

Thomas R, Bigelow PI, Keefe TJ, Yang RSH (1996). Variability in biological exposure indices using physiologically based pharmacokinetic modeling and Monte Carlo simulation. *Am Ind Hyg Assoc J* 57: 23-32

Vermeulen R, Stewart P, Kromhout H (2002). Dermal exposure assessment in occupational epidemiologic research. *Scand J Work Environ Health* 28: 371-385

Viau C, Lafontaine M, Payan JP (2004). Creatinine normalization in biological monitoring revisited: the case of 1-hydroxypyrene. *Int J Occup Med Environ Health* 77: 177-185

Wang D, Kamijima M, Imai R, Suzuki T, Kameda Y, Asai K, Okamura A, Naito H, Ueyama J, Saito I, Nakajima T, Goto M, Shibata E, Kondo T, Takagi K, Takagi K, Wakusawa S (2007). Biological monitoring of pyrethroid exposure of pest control workers in Japan. *J Occup Health* 49 (6): 509-514

Whyatt RM, Garfinkel R, Hoepner LA, Andrews H, Holmes D, Williams MK, Reyes A, Diaz D, Perera FP, Camann DE, Barr DB (2009). A Biomarker validation study of prenatal chlorpyrifos exposure within an inner-city cohort during pregnancy. *Environ Health Perspect* 117 (4): 559-567

Woollen BH, Marsh JR, Laird WJD, Lesser JE (1992). The metabolism of cypermethrin in man: differences in urinary metabolite profiles following oral and dermal administration. *Xenobiotica* 22: 983-991

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: 1968–1973

Zuur A, Ieno EN, Walker N, Saveliev AA, Smith GM (2009). *Mixed effects models and extensions in ecology with R*. Statistics for Biology and Health. Springer Science, 574 p.

**Table 1. Variables documented by questionnaire during the cypermethrin exposure study.**

	<b>Variables</b>	<b>Description</b>
<b>Physiological information</b>	Age	Expressed in years
	Gender	Male/ female
	Weight	Expressed in kg
	Height	Expressed in m
	Body mass index (BMI)	Calculated as weight/height <sup>2</sup>
	Symptoms	Nausea, headaches, stomach cramps, diarrhea, loss of appetite, dizziness, sweating, tearing, skin irritation, eye irritation, dry skin, excessive tiredness
<b>Socio-demographic data</b>	Highest education level	Primary or high school and community college or university
	Country of birth	
	Ethnicity	Caucasian or Hispanic origin of the worker and its parents and grand-parents
<b>Life habits</b>	Activities	Types of activities and frequency
	Tobacco use	Summarized in dichotomous variable: yes/no
	Alcohol consumption	Summarized in dichotomous variable: yes/no
	Medication	Summarized in dichotomous variable: yes/no; type of medication, dosing and frequency documented
<b>Household exposure</b>	Direct exposure to pesticides	Domestic pest control treatment, therapeutic treatments against head lice, exposure to bug repellents, pet shampoo, extermination activity, summarized as dichotomous variables: yes/no
	Consumption of cereals, fruits and vegetables (organic or not)	Number of daily portions of each category and types (frozen or fresh) considered as a continuous discrete variable. Expressed as mean daily portions over the three-day collection period according to the Canadian food guide (Health Canada, 2011).
<b>Work exposure</b>	Type of culture	Lettuce, onions, green onions, carrots, herbs
	Duration of exposure	Period of preparation/mixing/application of cypermethrin formulation or work in a treated area treated as a continuous variable
	Protection equipment	Type and % of time worn during exposure period.
	Type of work	Considered as a dichotomous variable: preparation/mixing/application of cypermethrin-based formulation and decontamination of the material or inspection of fields, weeding and harvesting
<b>Sampling</b>	Time of each void	To calculate excretion rates and report time profile.
	Loss of urine	Complete or partial loss of a void during the study, when and why.

**Table 2. Characteristics of the study subjects**

<b>Subject characteristics n =26 worker profiles*</b>	<b>Distribution</b>
Gender: n (%)	
Male	22 (85%)
Female	4 (15%)
Age: years	
Median (Min-Max) <sup>a</sup>	37 (25-63)
Weight: kg	
Median (Min-Max) <sup>a</sup>	70.0 (44.4-113.0)
Height: m	
Median (Min-Max) <sup>a</sup>	1.62 (1.48-1.78)
BMI	
Median (Min-Max) <sup>a</sup>	26.1 (18.8-38.0)
Educational level: n (%)	
Primary	7 (27%)
High school	9 (35%)
College	5 (19%)
University	3 (12%)
ND	2 (8%)
Physical activities: n (%)	
< once a week	7 (27%)
Once a week	70 (27%)
times a week	5 (19%)
> 3 times a week	6 (23%)
ND	1 (4%)
Ethnicity: n (%)	
Hispanic origin	19 (73%)
Causasian	7 (27%)
Smokers: n (%) <sup>b</sup>	
Yes	2 (8%)
No	22 (84%)
ND	2 (8%)
Alcohol consumption: n (%) <sup>b</sup>	
Yes	2 (8%)
No	21 (80%)
ND	3 (12%)

Medication: n (%) <sup>b,c</sup>		
	Yes	4 (15%)
	No	22 (85%)
		2 (0-10)
Dietary intake: mean daily portions of fruits,vegetables and cereals <sup>a,d</sup> (min-max)		

---

<sup>a</sup> Log normal distribution.

<sup>b</sup> More than 1 consumption or cigarette during the 3-day study (day1 to day 3).

<sup>c</sup> Except contraceptive pills.

<sup>d</sup> Mean daily portions of fruits, vegetables and cereals over the 3-day collection period, according to portions recorded in the Canadian food's guide (Health Canada, 2011).

\* Eight workers provided two serial urinary collections.

**Table 3. Work practices and conditions during the 3-day time course study (days 1 to 3).**

Characteristics	Values	
	Out of all the 34 worker profiles <sup>a</sup>	For the 5 applicators only
Farms: n (%)		
A	26 (76%)	
B	5 (15%)	
C	3 (9%)	
Main task: n (%)		
Preparation and application of cypermethrin-containing formulation	5 (15%)	
Weeding	10 (29%)	
Harvesting	3 (9%)	
Field inspection	4 (12%)	
Weeding and harvesting	12 (35%)	
Main exposure duration on the first day: h/day (min-max)	5.6 (0.5- 10.0)	
Protective equipment during the main exposure (day 1): n (%)		
None	0 (0%)	
Level 1 <sup>b</sup>	29 (85%)	
Level 2 <sup>c</sup>	5 (15%)	
Use of bug repellents or anti-lice shampoo: n (%)		
Yes	0 (0%)	
No	34 (100%)	
Place of preparation of pesticide: n (%)		
Indoor		2 (40%)
Outdoor		2 (40%)
NR <sup>d</sup>		1 (20%)
Use of filters on the cabin vehicle during spraying: n (%)		
Yes		3 (60%)
No		2 (40%)
Wearing of mask for additional protective equipment <sup>b</sup> : n (%)		
Yes		4 (80%)
No		1 (20%)

---

Wearing of gloves for additional protective equipment <sup>b</sup> : n (%)	
Yes	5 (100%)
No	0 (0%)

---

<sup>a</sup> In total, 26 workers were exposed to cypermethrin and 8 of those provided two series of urine collections. In total, 34 exposure profiles were characterized.

<sup>b</sup> Protective equipment included boots, long sleeves shirt and pants and in some instances an apron.

<sup>c</sup> With at least one other protective equipment like plastic/rubber gloves and mask; limited to applicators.

<sup>d</sup> Not reported.



**Table 4. Distribution of 3-PBA and *trans*-DCCA concentrations ( $\mu\text{mol/mol creatinine}$ ) during the 3-day follow-up in the 34 workers exposed to cypermethrin.**

Worker	Number of urine samples (n)	3-PBA ( $\mu\text{mol/mol creat.}$ )					<i>trans</i> -DCCA ( $\mu\text{mol/mol creat.}$ )				
		GM	5 <sup>th</sup> percentile	Median	95 <sup>th</sup> percentile	Maximum	GM <sup>d</sup>	5 <sup>th</sup> percentile	Median	95 <sup>th</sup> percentile	Maximum
T1 <sup>a</sup>	18	0.232 <sup>b</sup>	0.061	0.194	0.623	0.72	<LOD	<LOD	0.501	0.571	
T2	22	0.200 <sup>b</sup>	0.104	0.195	0.398	0.809	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	
T3	20	0.099	<LOD	0.119	0.256	0.31	<LOD	<LOD	0.172	0.239	
T4	18	0.084	0.0500	0.075	0.161	0.204	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	
T6	14	0.124	0.0440	0.117	0.244	0.294	<LOD	<LOD	0.122	0.350	
T7	22	0.124	0.0380	0.073	1.06	1.7	<LOD	0.192	0.925	1.32	
T7b	18	0.096	<LOD	0.110	0.163	0.237	<LOD	0.131	0.244	0.291	
T8	18	0.135	<LOD	0.133	0.287	0.295	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	
T10	22	0.320 <sup>b</sup>	0.190	0.327	0.529	0.563	<LOD	0.321	0.524	0.556	
T10b	16	0.261 <sup>b</sup>	0.109	0.230	0.514	0.548	<LOD	<LOD	0.143	0.574	
T11	22	0.214 <sup>b</sup>	<LOD	0.210	0.486	0.816	<LOD	<LOD	<LOD	0.637	
T11b	18	0.083	<LOD	0.073	0.184	0.345	<LOD	<LOD	0.282	0.322	
T12	22	0.113	<LOD	0.117	0.153	0.153	<LOD	<LOD	0.231	0.702	
T13	22	0.776 <sup>b</sup>	0.208	0.826	4.23 <sup>c</sup>	7.08	<LOD	<LOD	0.499	0.591	
T13b	18	0.171 <sup>b</sup>	0.0590	0.174	0.305	0.334	<LOD	<LOD	0.357	0.422	
T14	22	0.080	0.0200	0.081	0.431	0.508	<LOD	<LOD	0.796	0.827	
T15	18	0.086	<LOD	0.077	0.159	0.156	<LOD	<LOD	0.023	0.156	
T18	20	0.099	<LOD	0.088	0.208	0.333	<LOD	<LOD	0.326	0.338	
T19	16	0.166 <sup>b</sup>	0.0630	0.169	0.236	0.243	<LOD	0.048	0.112	0.136	
T20	21	0.566 <sup>b</sup>	0.257	0.527	1.10	1.93	<LOD	0.127	0.363	0.443	
T21	22	0.147	0.0030	0.134	0.314	0.393	<LOD	<LOD	0.417	0.566	
T21b	19	0.14	<LOD	0.153	0.225	0.261	<LOD	<LOD	0.329	0.370	
T22	22	0.123	0.0030	0.125	0.200	0.205	<LOD	<LOD	0.207	0.255	

<b>T23</b>	20	0.089	0.0660	0.092	0.129	0.15	<LOD	<LOD	0.026	0.529
<b>T24</b>	21	0.158	<LOD	0.183	0.186	0.263	<LOD	0.011	0.163	0.250
<b>T24b</b>	20	0.093	<LOD	0.086	0.254	0.253	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
<b>T25<sup>a</sup></b>	17	0.662 <sup>b</sup>	0.170	0.747	1.62 <sup>c</sup>	1.75	<LOD	0.452	1.27	1.59
<b>T25b<sup>a</sup></b>	20	0.618 <sup>b</sup>	0.238	0.567	1.46 <sup>c</sup>	2.07	0.224	0.395	1.36	1.42
<b>T28</b>	22	0.265 <sup>b</sup>	<LOD	0.311	0.501	0.618	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
<b>T29<sup>a</sup></b>	12	1.668 <sup>b</sup>	0.619	1.28	9.07 <sup>c</sup>	11.5	0.0694	0.870	2.13 <sup>e</sup>	2.17
<b>T29b<sup>a</sup></b>	16	0.938 <sup>b</sup>	0.326	0.820	4.02 <sup>c</sup>	12.3	<LOD	0.250	1.34	3.99
<b>T32</b>	17	0.233 <sup>b</sup>	0.118	0.211	0.451	0.395	<LOD	<LOD	0.291	0.353
<b>T33</b>	24	0.212 <sup>b</sup>	<LOD	0.211	0.270	1.74	<LOD	<LOD	0.149	0.167
<b>T34</b>	16	0.129	<LOD	0.133	0.248	0.175	<LOD	<LOD	0.248	0.466

<sup>a</sup> Worker applying pesticide.

<sup>b</sup> Geometric mean (GM) for 3-PBA higher than GM value of 0.31 µg/g creatinine or 0.164 µmol/mol creatinine reported in the Canadian Health Measures Survey (CHMS, 2013) for individuals aged 6 to 79 years old (cycle 1).

<sup>c</sup> 95<sup>th</sup> percentile value for 3-PBA higher than the 95<sup>th</sup> percentile of 2.8 µg/g creatinine or 1.48 µmol/mol creatinine reported in the Canadian Health Measures Survey (CHMS, 2013) for individuals aged 6 to 79 years old (cycle 1).

<sup>d</sup> Not calculated because the number of samples with values below the LOD is > 30%.

<sup>e</sup> 95<sup>th</sup> percentile value for *trans*-DCCA higher than the 95<sup>th</sup> percentile of 3.0 µg/g creatinine or 1.62 µmol/mol creatinine reported in the Canadian Health Measures Survey (CHMS, 2013) for individuals aged 6 to 79 years old (cycle 1).

**Table 5. Distribution of 3-PBA and *trans*-DCCA urinary excretion rates (pmol/h/kg bw) during the 3-day follow-up of the 34 workers profiles exposed to cypermethrin.**

Worker	Number of urine samples (n)	3-PBA (pmol/h/kg bw)						<i>trans</i> -DCCA (pmol/h/kg bw)				
		GM	Minimum	5 <sup>th</sup> percentile	Median	95 <sup>th</sup> percentile	Maximum	GM <sup>b</sup>	Minimum	5 <sup>th</sup> percentile	Median	95 <sup>th</sup> percentile
T1 <sup>a</sup>	18	2.32	<LOD	<LOD	1.98	9.18	15.9	<LOD	<LOD	<LOD	4.49	6.35
T2	22	2.01	<LOD	0.0240	2.06	4.47	7.41	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
T3	20	1.16	<LOD	<LOD	1.77	4.03	11.2	<LOD	<LOD	<LOD	2.71	22.9
T4	18	0.497	<LOD	<LOD	0.460	1.04	1.54	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
T6	14	0.614	<LOD	<LOD	0.826	2.29	4.16	<LOD	<LOD	<LOD	1.73	4.94
T7	22	1.47	<LOD	0.0050	1.20	9.97	12.5	<LOD	<LOD	2.465	10.9	17.2
T7b	18	0.847	<LOD	<LOD	0.870	2.31	4.27	<LOD	<LOD	1.098	2.73	6.00
T8	18	1.17	<LOD	<LOD	1.13	2.41	3.06	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
T10	22	2.93	<LOD	0.0200	3.10	8.68	8.77	<LOD	<LOD	2.638	7.95	8.91
T10b	16	1.98	<LOD	0.221	2.59	4.93	5.26	<LOD	<LOD	<LOD	1.38	5.51
T11	22	2.13	<LOD	<LOD	2.23	4.74	4.84	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	4.01
T11b	18	0.757	<LOD	<LOD	0.733	1.48	3.94	<LOD	<LOD	<LOD	3.15	3.16
T12	22	1.02	<LOD	<LOD	1.08	1.59	1.76	<LOD	<LOD	<LOD	2.12	2.52
T13	22	7.18	<LOD	0.0710	5.83	43.5	59.7	<LOD	<LOD	<LOD	5.46	6.50
T13b	18	1.22	<LOD	0.2840	1.58	3.34	3.50	<LOD	<LOD	<LOD	1.53	2.83
T14	22	0.731	<LOD	0.0100	0.732	2.11	2.39	<LOD	<LOD	<LOD	2.23	2.26
T15	18	0.545	<LOD	<LOD	0.662	1.12	1.43	<LOD	<LOD	<LOD	0.0776	0.518
T18	20	0.942	<LOD	<LOD	1.03	1.78	3.6	<LOD	<LOD	<LOD	4.66	5.80
T19	16	2.35	<LOD	<LOD	2.54	5.00	6.14	<LOD	<LOD	0.494	1.99	2.06
T20	21	5.73	<LOD	<LOD	5.12	12.4	17.3	<LOD	<LOD	1.072	4.04	5.63

<b>T21</b>	22	1.71	<LOD	<LOD	2.13	3.71	4.17	<LOD	<LOD	<LOD	4.71	6.00
<b>T21b</b>	19	1.44	<LOD	<LOD	1.50	2.70	2.76	<LOD	<LOD	<LOD	3.547	3.58
<b>T22</b>	22	1.14	<LOD	<LOD	1.38	1.97	2.52	<LOD	<LOD	<LOD	0.697	2.97
<b>T23</b>	20	0.740	<LOD	<LOD	0.841	1.22	1.74	<LOD	<LOD	<LOD	0.307	6.15
<b>T24</b>	21	0.825	<LOD	<LOD	1.07	1.67	2.99	<LOD	<LOD	0.153	1.32	1.63
<b>T24b</b>	20	0.806	<LOD	<LOD	0.828	2.67	1.86	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
<b>T25<sup>a</sup></b>	17	6.34	<LOD	0.359	6.57	16.4	19.9	<LOD	<LOD	4.93	14.6	18.0
<b>T25b<sup>a</sup></b>	20	4.95	<LOD	1.07	4.12	25.8	68.7	<LOD	0.999	3.59	15.6	49.1
<b>T28</b>	22	3.26	<LOD	<LOD	3.50	6.85	7.36	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
<b>T29<sup>a</sup></b>	12	9.99	<LOD	1.44	8.77	70.9	96.4	<LOD	0.268	4.14	16.4	17.5
<b>T29b<sup>a</sup></b>	16	6.72	<LOD	2.40	5.98	26.8	78.3	<LOD	<LOD	1.83	9.14	25.4
<b>T32</b>	17	1.78	<LOD	0.245	1.95	3.03	3.80	<LOD	<LOD	<LOD	0.594	1.36
<b>T33</b>	24	1.72	<LOD	<LOD	1.71	3.67	19.0	<LOD	<LOD	<LOD	1.56	3.88
<b>T34</b>	16	0.926	<LOD	<LOD	0.943	2.19	2.61	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

<sup>a</sup> Worker applying pesticide.

<sup>b</sup> Not calculated because the number of samples with values below the LOD is > 30%.

**Table 6: Predictors of 3-PBA levels in the urine of workers (n=34) using a linear mixed-effects model (MIMX).**

Predictors	pmol/h/kg bw			µmol/mol creatinine			
	Univariate	Multivariate		Univariate analysis <sup>a</sup>	Multivariate		
	analysis <sup>a</sup>	analysis			Analysis		
	Exp(β) (95% CI)	Exp(β) (95% CI)	p value	Exp(β) (95% CI)	Exp(β) (95% CI)	p value	
<b>Farm size</b>	< 50 workers	2.72 (1.06-6.97)	2.18 (0.68-7.00)	0.184	2.03 (0.99-4.14)	1.75 (0.76-4.07)	0.183
	≥ 50 workers	Reference			Reference		
<b>Age</b>	Years (log)	2.24 (0.02-292.98)	1.96 (0.01-311.44)	0.788	5.69 (0.08-412.09)	2.57 (0.07-98.36)	0.601
<b>BMI</b>	(kg/m <sup>2</sup> )	1.09 (0.99-1.21)			1.10 (1.02-1.19)		
<b>Ethnicity</b>	Hispanic origin	0.36 (0.15-0.90)			0.62 (0.30-1.25)		
	Caucasian	Reference			Reference		
<b>Education</b>	Elementary and High school	0.98 (0.41-2.32)	1.11 (0.46-2.67)	0.811	1.41 (0.75-2.66)	1.47 (0.78-2.77)	0.221
	College and University	Reference			Reference		
<b>Main professional task</b>	Weeding/Harvest/Inspection	0.15 (0.05-0.42)	0.28 (0.07-1.10)	0.067	0.27 (0.12-0.60)	0.38 (0.14-1.20)	0.054
	Application of pesticide	Reference			Reference		
<b>Main exposure duration on the first day (h)</b>		0,85 (0,71-1,02)			0.90 (0.82-1.00)		
<b>Dietary intake of fruits, vegetables and cereals (mean daily portions)</b>		1,22 (1,00-1,47)			1.12 (1.00-1.25)		
<b>Gender</b>	Male	1.39 (0.12-16.38)			1.94 (0.74-5.06)		
	Female	Reference			Reference		
<b>Alcohol consumption</b>	No	0.62 (0.06-6.53)			1.07 (0.43-2.64)		
	Yes	Reference			Reference		
<b>Smoking habit</b>	No	4.32 (2.29 <sup>10<sup>-29</sup></sup> -8.24 <sup>10<sup>-29</sup></sup> )			2.82 (0.97-8.22)		
	Yes	Reference			Reference		

<b>Medication</b>	No	0.37 (0.10-1.30)	0.40 (0.16-1.02)
	Yes	Reference	Reference

---

<sup>a</sup> All the variables were tested individually in the model. The variable “time” was considered as repeated measure.

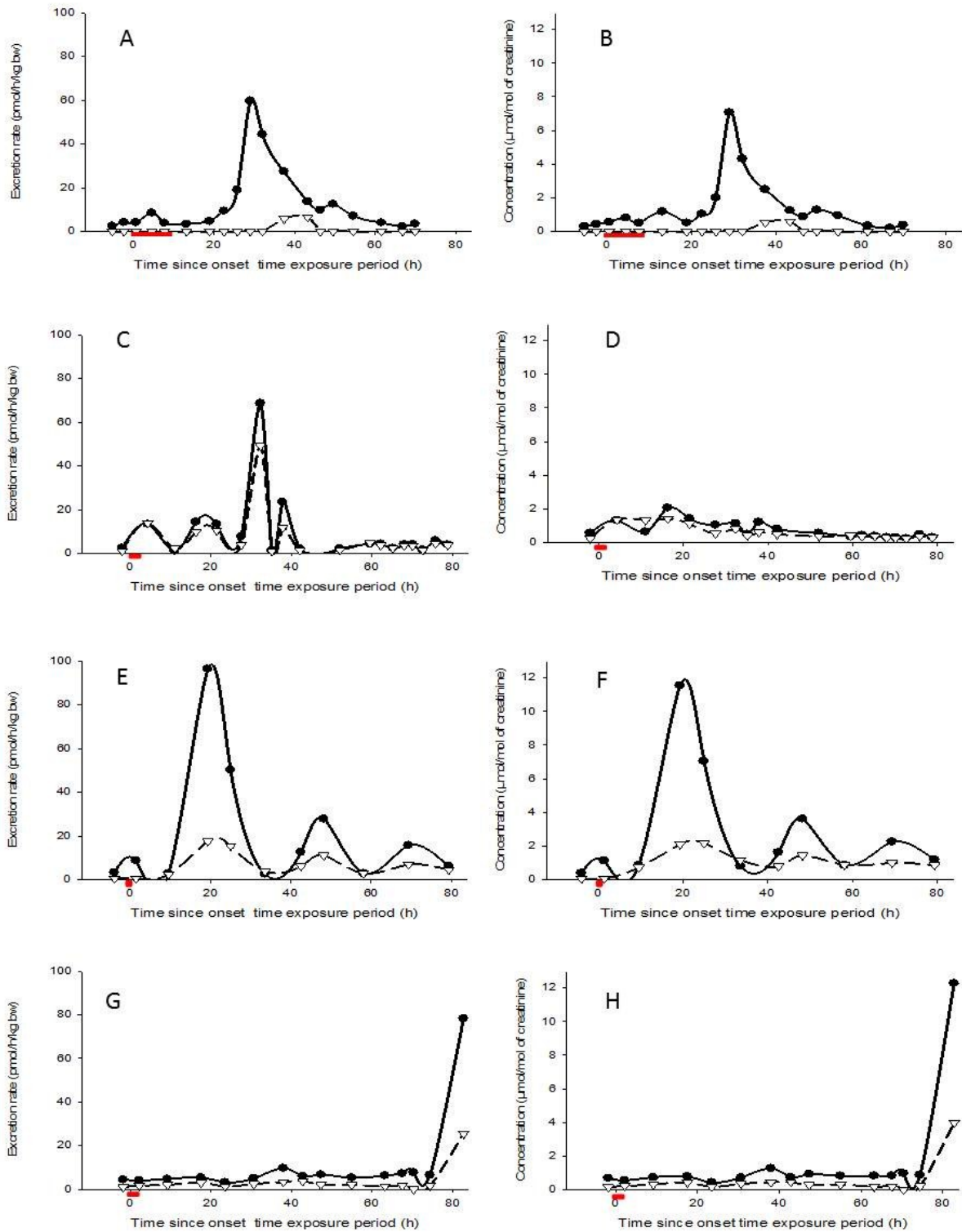
<sup>b</sup>  $\beta$  estimates and 95% CI were exponentiated from logarithmic values.

Note: Within-subject variance (95% CI): 5.50 (4.60-6.40);  $p < 0.0001$ .

## Captions to figures

Figure 1. Time courses of *trans*-DCCA ( $\Delta$ ) and 3-PBA ( $\bullet$ ) in the urine of workers over a 3-day period following an exposure episode to cypermethrin for the classified cluster of high exposure (expressed as pmol/h/kg bw and  $\mu\text{mol/mol}$  creatinine). Worker T13 performing weeding: A and B; pesticide applicator T25b: C and D; pesticide applicator T29a: E and F; pesticide applicator T29b: G and H. — [red] represents exposure duration.

Fig. 1.









## Chapitre 6

# DISCUSSION SUR CE QU'APPORTE CETTE THÈSE

---



## **6. DISCUSSION**

Le présent projet a permis l'évaluation de l'exposition aux pyréthriinoïdes en conditions contrôlées et professionnelles en appliquant une approche toxicocinétique. Cette section présente les considérations méthodologiques, théoriques et pratiques qui découlent de ces avancées scientifiques. Cette discussion est structurée en quatre parties : le cheminement intellectuel reliant chacun des articles retrouvés dans cette thèse et permettant d'atteindre les objectifs de départ, les répercussions en biosurveillance individuelle et populationnelle, les considérations en analyse et gestion du risque découlant des connaissances scientifiques de ce projet et les perspectives de recherche qui seraient intéressantes à élaborer.

### **6.1. Connaissances scientifiques et atteinte des objectifs**

Ce chapitre sera divisé en quatre sous-sections qui permettront de développer les répercussions scientifiques de ce projet de thèse : le développement de la méthode analytique nécessaire à l'analyse des métabolites des pyréthriinoïdes, ce qui a été suivi d'études toxicocinétiques en conditions contrôlées de deux pyréthriinoïdes en milieu clinique, l'intégration de ces notions toxicocinétiques dans un suivi de biosurveillance professionnelle et l'étude exploratoire des biomarqueurs d'effets provenant des échantillons collectés lors des projets en conditions contrôlées et en conditions professionnelles.

#### **6.1.1. Développement d'une méthode analytique en spectrométrie de masse comme outil efficace en biosurveillance**

L'étape première dans la réalisation de ce projet de thèse fut le développement d'une méthode analytique efficace pouvant être utilisée en biosurveillance. Une méthode unique en spectrométrie de masse quadripolaire à temps de vol (Q/ToF) a été développée afin de répondre à cette nécessité d'analyser les métabolites des pyréthriinoïdes. Un Q/ToF est un

instrument ayant une résolution élevée pouvant confirmer avec un haut degré de certitude l'identité d'une molécule (Nunez *et al.*, 2004). Un Q/ToF offre une sensibilité permettant détecter jusqu'à des quantités injectées de l'ordre du femtogramme, avec une précision de la masse de 2 ppm et un pouvoir de séparation des masses d'une résolution de 20 000 à 25 000 (allant facilement jusqu'à 4 décimales pour une petite molécule de 200 Daltons) (Ferrer et Thurman, 2013). Toutefois, aucune méthode analytique pour les métabolites des pyréthriinoïdes sur un instrument Q/ToF n'avait été publiée au commencement de cette thèse.

Lors du développement de la méthode, nous avons eu un choix analytique à faire et selon le métabolite optimisé dans la méthode (c'est-à-dire selon l'ajustement des paramètres du spectromètre de masse en fonction du métabolite ciblé), le signal était différent. Comme le 3-PBA était le métabolite le plus étudié, nous nous sommes concentrés sur ce dernier. Le taux de détection pour ce métabolite pour notre méthode est d'ailleurs similaire aux autres études publiées (75%- Barr *et al.*, 2010).

Des contrôles de qualité (blancs enrichis ainsi que des contrôles positifs) ont été insérés à des intervalles réguliers à l'intérieur d'un même lot d'analyses. Ces échantillons ont permis de déterminer des paramètres de validation de la méthode analytique et d'assurer la constance analytique. Les paramètres de validation obtenus pour la méthode de biosurveillance montrent une bonne stabilité intra-lot. Les analyses des échantillons ont été réalisées par lot pour établir la cinétique chez un même individu et nous avons vérifié que la variabilité intra-lot, quantifiée à l'aide d'enrichis ayant une concentration connue, demeurait inférieure à 15%. Les échantillons de contrôle de qualité qui montraient, à l'intérieur d'un même lot, un coefficient de variation supérieur à 15% n'ont pas été considérés et les analyses ont été refaites afin de s'assurer que les paramètres instrumentaux et que la courbe de calibration étaient valides. Le coefficient de variation attribuable à la méthode analytique est de 15% : il n'y a donc que seulement 15% de la variabilité intra et inter-individuelle qui puisse potentiellement s'expliquer par des considérations techniques. Aussi, tous les échantillons d'un même travailleur ou d'un même volontaire étaient analysés dans un même lot afin de contrer la variation inter-lot. De plus, un programme de fine maintenance quotidienne mesurant des masses de calibration instrumentale était réalisé pour obtenir un écart d'au maximum de 2 ppm

sur la masse attendue. L'instrument, qui est très sensible à des variations internes aussi bien qu'externes, a répondu aux besoins de ce projet de recherche malgré un léger manque de constance exprimé par la variabilité inter-lot.

La méthode analytique telle qu'optimisée dans le cadre de la présente thèse a permis aisément de quantifier les concentrations de métabolites pour tous les échantillons de volontaires sains lors de l'étude clinique. En ce qui concerne les échantillons des travailleurs, la méthode ré-optimisée a permis de quantifier le 3-PBA adéquatement. Alors que la méthode était adéquate pour l'étude chez les volontaires sains ayant de très fortes concentrations dans le sang et l'urine, la méthode n'offrait pas une sensibilité optimale pour les échantillons urinaires des travailleurs. La sensibilité de la méthode analytique en Q/ToF a d'ailleurs été une contrainte au niveau des données quantitatives ayant pu être recueillies lors de la biosurveillance de l'exposition des travailleurs car nous n'avons pas pu obtenir le profil du *cis*-DCCA. Le *cis*-DCCA était quantifiable dans seulement 11% des échantillons urinaires de travailleurs, comparativement aux études de Barr *et al.* (2010), Hardt et Angerer (2003), CHMS (Santé Canada, 2013), Couture *et al.* (2009) et Le Grand *et al.* (2012) où respectivement 32%, 54%, 99%, 96% et 97% des échantillons montraient des niveaux de *cis*-DCCA supérieurs à la limite de détection. Toutefois, en ayant quantifié deux biomarqueurs urinaires, ceci représente une avancée comparativement à plusieurs études qui ne quantifient que le 3-PBA et permet donc d'être plus spécifique quant à la source du pyréthrianoïde.

Un spectromètre de masse Q/TOF est un instrument qui est très sensible et mesure toutes les molécules en présence autant dans l'échantillon que dans le solvant et les bouteilles utilisées dans le système. Ceci peut mener à une augmentation du bruit de fond analytique et à des interférences analytiques lors d'évaluations de faibles niveaux de biomarqueurs d'exposition comme ce fut le cas pour les travailleurs. La comparaison des LOD provenant de méthodes développées montre que, dans les conditions d'optimisation atteintes dans le cadre de la thèse, la méthode est aussi sinon plus performante que plusieurs autres méthodes développées en spectrométrie de masse (tableau 8). En effet, 18 études ont rapporté des limites de détection pour les métabolites *cis et trans*-DCCA et 3-PBA avec un spectromètre de masse, allant de 0,5 à 0,003 µg/L (Angerer *et al.*, 1997; Arrebola *et al.*, 1999; Baker *et al.*, 2003; CDC, 2009;

Columé *et al.*, 2001; Corrion *et al.*, 2005; Couture *et al.*, 2009; Elflein *et al.*, 2003; Hardt et Angerer, 2003; Heudorf et Angerer, 2001; Khun *et al.*, 1996; Le Grand *et al.*, 2012; Leng *et al.*, 1997a; Leng *et al.*, 2006; Olsson *et al.*, 2004; Schettgen *et al.*, 2002; Wielgomas *et al.*, 2013).

Toutefois, ces études ne mentionnent souvent pas la méthode utilisée pour le calcul de la LOD. Comme il n'existe actuellement pas de consensus, la méthode retenue peut avoir un impact sur le résultat rapporté. Dans la présente thèse, la méthode initialement retenue a été dérivée de la méthode suggérée par Voigtman concernant la limite de détection méthodologique (Voigtman, 2008), mentionnant que la LOD devrait être calculée en fonction d'un facteur préalablement choisi multiplié par la déviation standard d'un blanc analytique et divisé par la magnitude de la pente provenant de la courbe de calibration. Tous les échantillons et courbes de calibration ont été analysés au moins 7 fois (généralement 16 fois). La méthode de calculs de LOD qui a été retenue est assez restrictive. Les valeurs des LOD que nous obtenons sont entre 0,1 à 0,3 µg/L. Cette LOD est confirmée par une constatation expérimentale car elle est similaire à la plus petite valeur quantifiée dans notre projet divisée par 3,3.

Cette définition de LOD, variant selon les groupes de recherche et d'un type d'instrument à l'autre, résulte d'un choix méthodologique et pourrait expliquer certaines différences de LOD en comparaison à celles déjà publiées dans la littérature.



**Tableau 1. Limites de détection des méthodes analytiques rapportées sur les métabolites des pyréthriinoïdes réalisées avec un spectromètre de masse**

Auteurs	Instrument	Limites de détection rapportées (LOD)		
		(µg/L)		
		<i>trans</i> -DCCA	<i>cis</i> -DCCA	3-PBA
Angerer <i>et al.</i> , 1997	GC-MSD	0,5	0,5	0,5
Arrebola <i>et al.</i> , 1999	GC-trap	0,006	0,005	0,003
Baker <i>et al.</i> , 2003	HPLC-Q/Q	0,5	0,5	0,1
CDC, 2009	HPLC-Q/Q	0,4	0,1	0,1
Columé <i>et al.</i> , 2001	GC-MS	0,1	0,1	0,1
Corrion <i>et al.</i> , 2005	GC-MS	<0,2	<0,2	0,78
Couture <i>et al.</i> , 2009	GC-MSD	0,0096	0,0072	0,013
Elflein <i>et al.</i> , 2003	GS-MSD	0,1	0,1	NA
Hardt et Angerer, 2003	GC-MSD	0,5	0,5	0,5
Heudorf et Angerer, 2001	GC-MSD	0,1	0,1	NA
Khun <i>et al.</i> , 1996	GC-MS	0,5	0,5	0,5
Le Grand <i>et al.</i> , 2012	HPLC-Q/Q	0,015	0,015	0,015
Leng <i>et al.</i> , 1997a	GC-trap	0,5	0,5	0,5
Leng <i>et al.</i> , 2006b	GC-MS (x3)	0,01-0,30	0,02-0,58	0,01-0,15
Olsson <i>et al.</i> , 2004	HPLC-ESI-Q/Q	0,4	0,2	0,1
Schettgen <i>et al.</i> , 2002	GC-EI-MSD	0,05	0,05	0,05
Wielgomas <i>et al.</i> , 2013	GC-trap	0,1	0,1	0,1
<b>La nôtre</b>	<b>HPLC-Q/ToF</b>	<b>0,1</b>	<b>0,3</b>	<b>0,1</b>

La sensibilité ne permettrait probablement pas de quantifier les 10% des individus de la population générale (ECMS) ayant la plus faible exposition aux pyréthriinoïdes, population qui montre une valeur de 10<sup>e</sup> centile à environ 0,05 µg/L (Santé Canada, 2013), ce qui se retrouve sous nos LOD. Il est toutefois pertinent d'utiliser cette méthode en contexte de surveillance professionnelle.

Récemment, la sensibilité et variabilité de la méthode a été largement améliorée en diminuant le bruit de fond du signal de base de l'instrument. Certains paramètres d'ionisation dans la méthode utilisée ont été modifiés, soient la température du *drying gas*, du *sheath gas* ainsi que le voltage du *nozzle*. Les paramètres d'optimisation font varier beaucoup l'ionisation d'une molécule et cette ionisation dépend des propriétés chimiques de l'analyte en question. Nous avons également changé de fournisseur commercial de la phase mobile, ayant maintenant moins de contamination. La source d'ionisation a également été changée (Dual Jet Stream au lieu de Agilent Jet Stream) et les efforts de maintenance ont permis de diminuer les variations pour certains ajustements automatiques de l'instrument. La méthode qui sera utilisée pour les prochains échantillons aura désormais une variabilité intra-lot de 2,4 à 2,9% et une variation inter-lot de 5,8 à 7,7%, ce qui prouve que le spectromètre de masse est un instrument très compétitif qui se doit d'être considérée pour les futures études.

### **6.1.2. Étude clinique et toxicocinétique pour la perméthrine et cyperméthrine afin de combler des incertitudes scientifiques**

Tel que mentionné précédemment, la méthode analytique développée offrait une sensibilité plus que suffisante pour réaliser la quantification des métabolites des pyréthrinoïdes dans les échantillons fortement concentrés tels que retrouvés dans les échantillons urinaires et plasmatiques chez des volontaires sains exposés en conditions contrôlées. L'étude clinique de la perméthrine a permis de quantifier les paramètres toxicocinétiques suite à l'ingestion de ce pesticide. Les résultats sont retrouvés dans le premier article présenté dans cette thèse (Ratelle *et al.*, 2015a).

Nos résultats appuient les temps de demi-vies d'élimination de 7 à 16 h retrouvés dans la littérature (Eadsforth *et al.*, 1988; Khün *et al.*, 1999; Leng *et al.*, 1997a; 2006b; Sams and Jones, 2012; Woollen *et al.*, 1992). Notre étude est la première qui offre des données concernant un profil temporel humain de ces molécules par voie orale. Il a aussi été possible de vérifier la pertinence d'utiliser un modèle théorique pour simuler la toxicocinétique de ces molécules. En toxicologie théorique, il existe un calcul estimant le temps de résidence de la

molécule mère. L'équation [ $5 * t_{1/2} = 97\%$ ] est utilisée pour estimer le temps d'élimination en toxicologie et pharmacologie (Thompson, 2000). Dans la situation actuelle, nous procédons *a priori* à l'extrapolation du temps de résidence du métabolite à la substance mère. Ce temps étant dépendant de l'absorption et du métabolisme du produit mère. Comme ces étapes cinétiques par voie orale sont rapides, les temps de résidence et d'élimination seront similaires. Étant donné que 97% de la quantité totale retrouvée dans l'urine est éliminée dans les 84 h après l'administration ( $97\% = 5 * t_{1/2}$ ), on peut déduire que le temps de demi-vie de résidence des métabolites de la perméthrine est de 6 h pour le *trans*-DCCA, 7,5 h pour le *cis*-DCCA et 6 h pour 3-PBA. Cette demi-vie a été obtenue en estimant le moment du début de l'équilibre entre les niveaux plasmatiques et les niveaux urinaires totaux de métabolites, équivalent au temps associé à la concentration plasmatique maximale de métabolites. Ces durées sont très similaires à ce qui a été trouvé expérimentalement pour la demi-vie d'élimination des métabolites. L'utilisation de cette équation est alors une estimation facilement calculable, déterminant la demi-vie de la perméthrine et de ses métabolites. Toutefois, cette considération est d'ordre théorique et ne remplace pas les données expérimentales acquises dans ce projet. Ayant calculé les paramètres toxicocinétiques pour la perméthrine, une étude du profil cinétique en conditions contrôlées chez des volontaires exposés à la cyperméthrine a été réalisée à des fins de comparaisons avec la perméthrine. Un profil d'élimination typique de ces deux pyréthrinoïdes a été observé après avoir vérifié la similitude de leur comportement. Les résultats, présentés dans le deuxième article (Ratelle *et al.*, 2015b), indiquent que la perméthrine et la cyperméthrine ont des comportements toxicocinétiques semblables. Comme ces deux molécules représentent chacune un groupe différent de pyréthrinoïdes (type I et type II), les résultats laissent croire que la distribution et la demi-vie d'élimination seraient similaires pour plusieurs pyréthrinoïdes.

Il est à noter que l'établissement de la cinétique pour seulement six volontaires pour chaque pesticide a peu de pouvoir statistique. Toutefois, le passage du modèle animal au modèle humain est déjà une étape essentielle. Comme les volontaires ont probablement des profils génétiques et des habitudes de vie semblables étant caucasiens et étant de jeunes adultes en santé, les incertitudes liées à des polymorphismes ethniques ou à des maladies métaboliques

sont réduites. Pour minimiser l'exposition à des sources de pesticides autres que la dose administrée dans l'étude contrôlée, des repas biologiques déjà préparés pour les 4 jours de l'étude et des provisions ont été fournis aux participants.

Ces données permettront entre autre de raffiner un modèle mathématique développé par l'équipe. Les constantes reliées à la vitesse d'absorption et au taux de transfert du plasma à l'urine pourront alors être estimées afin de combler des incertitudes dans le modèle visant à reconstruire les doses d'exposition multi-routes. Il n'y avait antérieurement aucune donnée humaine publiée reliant la concentration plasmatique et urinaire. Les présents résultats sont innovateurs et permettront de calculer des constantes de transfert entre les deux compartiments que sont le sang et l'urine.

Les considérations techniques ont également influencé le choix de la voie d'exposition. Étant donné qu'il y a déjà une RfD orale d'établie par les organismes reconnus (EPA, 2006; 2009), la dose à administrer a été établie en fonction de cette valeur. Aussi, comme le pourcentage d'absorption par voie orale est important comparativement à la voie cutanée (36% vs 1%) (Woollen *et al.*, 1992), les concentrations de métabolites retrouvées dans les matrices étaient plus élevées par voie orale. Toutefois, la pertinence de la voie orale repose également sur l'hypothèse qu'une fois absorbé, le pesticide se distribue, se métabolise et s'élimine principalement de la même façon pour toutes les voies. Les temps de demi-vies d'élimination des métabolites entre les voies d'exposition, selon la littérature, indiquent un comportement probablement similaire de ces molécules. Après administration orale de cyperméthrine, les taux d'excrétion urinaire maximaux dans l'étude de Woollen *et al.* (1992) furent observés entre 8 et 24 h, alors qu'après administration cutanée les taux d'excrétion urinaire maximaux furent observés entre 12 et 36 h.

Une observation secondaire a permis d'établir les valeurs biologiques maximales atteintes suite à l'administration aiguë d'une dose orale équivalente à la dose de référence du US. EPA (EPA, 2006; 2009). Ces valeurs de référence sont importantes en analyse de risque et aident à baliser qualitativement ce risque pour la santé. En effet, les niveaux urinaires obtenus chez nos six volontaires suivant l'ingestion d'une dose de cyperméthrine équivalente à la dose de

référence du US. EPA (EPA, 2009) pourraient servir de valeur de référence biologique urinaire maximale à ne pas dépasser pour prévenir les effets liés à l'exposition à la cyperméthrine. Ceci constitue une approche utile pour définir une valeur limite biologique et aucune étude n'a été publiée chez des volontaires ayant été exposés à cette dose de référence par ingestion. La proposition d'une dose de référence est suggérée mais on se doit de préciser qu'un effectif si petit n'est que peu représentatif d'une population entière. On peut par contre retenir l'échelle des données provenant des volontaires ( $10^3$   $\mu\text{mol/mol}$  de créatinine). À elle seule, c'est un bon indicateur de mesures biologiques maximales attendues pour une exposition considérée comme associée avec des risques négligeables sur la base des données disponibles.

### **6.1.3. L'intégration des paramètres toxicocinétiques pour la mesure de l'exposition en milieu professionnel**

L'étude toxicocinétique en conditions contrôlées a permis de renforcer les connaissances sur le profil temporel d'élimination des métabolites de ces insecticides. Ce profil caractérisé par des paramètres toxicocinétiques permet alors d'interpréter adéquatement des données provenant d'échantillons collectés en conditions non contrôlées professionnelles. Le suivi temporel des biomarqueurs d'exposition aux pyréthriinoïdes chez des travailleurs a permis d'observer la variabilité des profils toxicocinétiques et de raffiner les stratégies de biosurveillance. En effet, des mesures de la variabilité inter et intra-individuelle, la caractérisation de l'exposition professionnelle et les paramètres associés à une plus forte exposition ont été documentés dans le troisième article. Une grande incertitude provenait du manque de données publiées sur les profils temporels typiques de biomarqueurs d'exposition aux pyréthriinoïdes chez des travailleurs et la variabilité potentielle chez un même individu.

Le profil temporel des métabolites de la perméthrine et cyperméthrine chez des volontaires exposés dans des conditions contrôlées a permis de mettre en évidence des temps de demi-vies d'élimination rapides, d'une durée d'un quart de travail, démontrant l'importance de réaliser l'échantillonnage au bon moment. De plus, des variations intra-individuelles importantes dans

les niveaux biologiques de métabolites de pyréthriinoïdes observés lors du suivi des travailleurs, confirment l'importance de bien choisir le moment de la collecte urinaire.

Les valeurs des mesures de biomarqueurs d'exposition chez les travailleurs agricoles du Québec montrent que les niveaux biologiques de métabolites de cyperméthrine sont en dessous des niveaux maximaux observés chez des volontaires exposés à une dose de référence orale, et pouvant être considéré comme une valeur de référence biologique à ne pas dépasser. Le risque d'effets indésirables à des niveaux inférieurs à cette valeur devrait donc être faible sur la base des données actuellement disponibles, comme dans le cas des travailleurs agricoles au Québec suivis dans le cadre de la présente thèse. Aucun des travailleurs n'a d'ailleurs ressenti de symptôme associé à l'exposition aux pyréthriinoïdes. Toutefois, étant donné que l'exposition chez les travailleurs suivis dans le présent travail est plus élevée que dans la population générale, tel qu'évalué par un suivi biologique, il s'agit d'une population à risque nécessitant une surveillance biologique. De plus, la caractérisation de l'exposition en milieu professionnel agricole québécois a également permis d'estimer les paramètres d'exposition associés à un risque plus élevé dans ce contexte, encore peu documenté jusqu'ici. Des tâches associées aux plus fortes expositions ont également été identifiées et des mesures en évaluation du risque et en gestion du risque pourront découler de cette constatation. Les travailleurs ayant les niveaux d'exposition les plus élevés sont les applicateurs de pesticides et des mesures de surveillance ciblées devraient être entreprises. Lors de l'étude chez les travailleurs agricoles, certaines limites ont été identifiées. Nous considérons chaque profil des travailleurs comme un profil autonome, même si certains (8 paires) étaient en réalité appariés pour un même travailleur. Cette considération découle d'un choix technique pour être en mesure d'utiliser le modèle mixte linéaire, du logiciel de statistiques SPSS. Aussi, trois types d'erreurs potentielles ont été identifiées lors de l'étude chez les travailleurs, mais nous ne pouvons pas mesurer leurs conséquences sur nos résultats actuels (différentiels ou non) : i) une erreur potentielle d'information provenant du faible taux de réponses à certaines questions du questionnaire, ii) une erreur potentielle d'information reliée à la désirabilité lors du volet terrain influençant le travailleur à respecter davantage les mesures d'hygiène et iii) une erreur potentielle de sélection reliée à la capacité de lecture nécessaire pour la participation au projet.

Le questionnaire auto-administré devant être rempli chaque soir et ne prenant que 4-5 minutes n'a pas été dûment rempli par près de la majorité des répondants. L'amélioration du questionnaire doit être constante et refléter les caractéristiques de la population cible. Le questionnaire utilisé dans cette étude a été inspiré d'un questionnaire utilisé précédemment par l'équipe lors d'une étude sur les fongicides et l'acrylamide (Berthet *et al.*, 2012; Normandin *et al.*, 2013), qui a été corrigé ensuite par trois chercheurs et a été révisé par un professionnel dans le domaine ayant comme langue maternelle l'espagnol et connaissant la culture latine des travailleurs migrants provenant du Mexique et du Guatemala. Toutefois, plusieurs questions jugées essentielles pour la mesure de l'exposition n'ont pas donné un taux de réponse acceptable. Ces questions comprenaient entre autres le moment, l'endroit et la méthode de la disposition des vêtements de travail et le moment du lavage corporel complet du travailleur. En effet, il a été démontré que le retrait des vêtements de travail sur le lieu professionnel était associé à une plus faible concentration de métabolites dans l'urine pour certains pesticides (Bradman *et al.*, 2008). Nous avons alors dû évaluer l'équilibre à obtenir entre les précisions des détails à acquérir et le taux de réponse souhaité; ces considérations seront réajustées dans un futur projet.

Un biais de désirabilité pourrait également avoir lieu. En effet, le chercheur était sur le terrain tous les jours de la collecte pour aider les travailleurs et pour gérer la collecte d'urine. Un désir de garder les meilleures habitudes d'hygiène pendant le travail ou minimiser l'exposition aux pesticides pendant l'étude aurait pu conduire à une sous-estimation de l'exposition normale. De plus, les individus se sentant plus à risque peuvent avoir refusé de participer, ce qui aurait pu conduire à un biais de sélection. Enfin, un biais pourrait être lié à la capacité de lecture qui était une condition préalable à la participation et à remplir le questionnaire auto-administré. Étant donné que 27% des participants avaient complété seulement des études du niveau primaire, ceci est un facteur à prendre en compte dans le taux de participation et la représentativité des travailleurs.

Finalement, la stratégie du volet réalisé chez les agriculteurs était de cibler un faible nombre de travailleurs mais en effectuant un suivi temporel détaillé (grand nombre d'échantillons par travailleur) afin de pouvoir documenter les meilleures stratégies de biosurveillance en milieu

professionnel. En conséquence, nous ne pouvons actuellement pas prétendre caractériser complètement l'agriculture québécoise en raison du nombre restreint de participants recrutés et le manque de représentativité possible grâce à la participation volontaire des entreprises intéressées. Toutefois, ce projet représente une première étape en vue de continuer l'analyse de risque chez des travailleurs agricoles en cultures maraichères, en contexte québécois.

#### **6.1.4. Les biomarqueurs d'effets précoces : résultats exploratoires métabolomiques précoces et effets rénaux potentiels**

Le dernier objectif de recherche a pu mener à la semi-quantification des effets métabolomiques observables dans une matrice urinaire humaine suite à l'exposition à de faibles doses du pyréthriinoïde cyperméthrine. Des changements dans le métabolome ont été observés entre les échantillons avant-après exposition et ces changements ont été reliés à certains effets néfastes possibles. Ces résultats sont retrouvés dans l'article présenté en annexe et qui proviennent d'un volet complémentaire de notre étude toxicocinétique. En effet, en plus des biomarqueurs d'exposition souvent étudiés, les biomarqueurs d'effets précoces sont une source d'information pouvant provenir d'une étude de biosurveillance et qui gagnent en popularité si on se réfère au nombre d'études publiées dans les dernières années.

Les échantillons urinaires ont été utilisés pour réaliser une analyse semi-quantitative des biomarqueurs d'effets précoces du métabolome. Il n'a pas été possible d'identifier à l'heure actuelle un schéma unique d'effets métabolomiques associé à l'exposition aux pyréthriinoïdes à cause du manque d'études disponibles dans ce domaine. Les résultats semi-quantitatifs d'exposition aiguë chez des volontaires suggèrent des effets métabolomiques différents de ceux observés chez les travailleurs agricoles tout en montrant une diminution de l'excrétion globale des acides aminés. Toutefois, chez ces deux groupes (volontaires et travailleurs), des taux d'excrétion plus faibles de certains acides aminés et de leurs dérivés dont la bêtaïne, la guanidoacetate, la lysine, l'alanine et la thréonine ont été trouvés, tandis que les résultats métabolomiques uniquement chez les travailleurs analysés ont indiqué une augmentation de l'hippurate. L'hippurate appartient au groupe des toxines urémiques qui interfèrent avec les processus physiologiques et métabolomiques normaux; il participe à la correction de l'acidose



métabolique, se développant en une des principales conséquences de la réduction de la fonction rénale et l'accélération de la progression des maladies rénales (Dzurik *et al.*, 2001). Une différence dans les métabolites endogènes associés à une certaine toxicité rénale a été observée par certains auteurs (Holmes *et al.*, 1998b; 2000). En d'autres termes, cet indice suggère qu'une exposition faible et chronique considérée comme sécuritaire à l'heure actuelle pourrait augmenter le risque de dommages rénaux potentiels. L'association n'est pourtant pas une relation de cause à effet et plusieurs facteurs seraient à considérer pour poursuivre cette réflexion en santé publique, notamment la plausibilité biologique, la temporalité plus détaillée et la consistance des résultats (Schünemann *et al.*, 2011). D'autres travaux sont requis étant donné le faible effectif des sujets participants à l'étude et la difficulté d'interpréter des données métabolomiques.

#### **6.1.5. Avantage et limites de la recherche**

Comme mentionnée précédemment, une limite analytique reliée à la méthode de spectrométrie de masse développée aux fins du présent travail, ainsi que certains biais de sélection et d'information lors de l'étude en milieu de travail ont été soulevés. Toutefois, la conception du projet répond à des considérations techniques et scientifiques justifiables tel que mentionné précédemment. Aussi, comme le mentionne Barr *et al.* (2006), parmi les recommandations pour la conception d'études en biosurveillance, il est essentiel d'identifier et de connaître les incertitudes reliées au projet pour être en mesure d'interpréter les données adéquatement. De plus, les contributions méthodologiques et théoriques découlant de ce projet de thèse ne sont pas négligeables et apportent des connaissances utiles au domaine de la science en générale et en analyse de risque. Des biomarqueurs d'exposition qui ont fait leur preuve ont été utilisés pour tracer un profil toxicocinétique temporel humain complet et de nouveaux biomarqueurs d'effets ont été trouvés.

## **6.2. Contribution du projet à l'interprétation des résultats de biosurveillance de l'exposition aux pyréthrinoïdes**

Les résultats qui découlent de cette thèse permettront de raffiner les stratégies de biosurveillance. En effet, l'évaluation des paramètres individuels cinétiques permet d'obtenir une meilleure interprétation de la surveillance individuelle. Aussi, ces données offrent des perspectives intéressantes sur l'interprétation de surveillance populationnelle. Il en sera mention dans les sections suivantes.

### **6.2.1. Utilité des études toxicocinétiques en termes de biosurveillance individuelle**

Des données quantitatives de métabolites, soient de demi-vies d'élimination, de temps requis pour l'atteinte d'une concentration maximale dans l'urine et le sang, ainsi que d'autres paramètres toxicocinétiques, comme le volume de distribution et la clairance totale, ont été calculés pour chaque métabolite. En effet, le profil plasmatique montrait une concentration maximale près de 2 h après administration et évoluait en parallèle avec le profil moyen urinaire qui présentait des demi-vies d'élimination se situant entre 4,5 et 5,7 h. Les temps de demi-vies d'élimination apparents de la molécule mère et de ses métabolites sont alors très courts, de moins d'un quart de travail. En d'autres mots, le profil individuel nous renseigne sur l'élimination temporelle attendue. Comme le volume de distribution est faible et indique que le métabolite reste principalement dans la circulation sanguine et n'est pas retenu dans l'organisme, les concentrations retrouvées dans l'urine sont associées à une exposition récente d'à peine quelques jours. Aussi, comme l'excrétion urinaire maximale est atteinte seulement 8 h après l'exposition, il serait plus facile d'identifier la source suivant un profil temporel urinaire complet, particulièrement si les concentrations urinaires continuent d'augmenter.

Comme mentionné précédemment, l'objectif de cette étude n'était pas principalement de caractériser le milieu mais d'évaluer l'impact de la variabilité intra-individuelle et inter-individuelle sur l'interprétation des résultats biologiques afin de raffiner la biosurveillance.

L'étude chez les travailleurs agricoles a permis de déterminer les meilleures stratégies de biosurveillance. Les données de suivis biologiques chez les travailleurs, ont montré des niveaux biologiques maximaux observés dans les heures suivant le début d'une exposition, entre 20 et 26 h. À cause de la variation intra-individuelle élevée, des mesures sériées d'au moins trois collectes urinaires distinctes seraient à préconiser pour le suivi de l'exposition aux pesticides non persistants chez les travailleurs dans un objectif de suivre l'étendue de l'exposition et donc la représenter plus fidèlement. Plus précisément, selon les données du présent travail, une première collecte urinaire complète avant le début d'une semaine de travail, une seconde en fin de quart de travail suivant le début d'une exposition en champs et finalement une troisième correspondant à la première miction du matin suivant permettraient d'obtenir une bonne indication de l'importance de l'exposition suite à une période d'exposition. C'est une considération alternative à la mesure ponctuelle d'échantillons dans un contexte de biosurveillance, qui se réalisait antérieurement.

### **6.2.2. La biosurveillance individuelle afin de raffiner la biosurveillance populationnelle**

Actuellement, les projets de biosurveillance populationnelle conduits par les organismes gouvernementaux ou para-gouvernementaux, dont l'Enquête canadienne des mesures de santé (ECMS/CHMS) au Canada et le National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) aux États-Unis reposent sur la collecte ponctuelle d'une urine. À la différence de ce que nous proposons, ces stratégies visent la caractérisation du milieu pour un large effectif, mais permet difficilement l'évaluation de l'exposition pour un petit groupe de travailleurs (tel que retrouvé dans la littérature : n=24 à 167), comme la majorité des projets de type recherche choisissent de faire, choix découlant de considérations de faisabilité technique et financière. Les stratégies actuelles que nous recommandons pré-suppose que nous avons une certaine connaissance du moment de l'exposition. Elle ne vise pas seulement à caractériser le milieu mais également à obtenir l'étendue de cette exposition en champs. En effet, en ayant une

meilleure connaissance de l'étendue de l'exposition, soit la valeur minimale et maximale provenant d'une stratégie telle que décrite dans nos travaux, il serait plus facile d'observer les répercussions de changements professionnels et d'interpréter ses données. Par exemple, cela permettrait d'évaluer entre autre l'impact d'une nouvelle réglementation en termes de délai de réentrée pour diminuer l'exposition ou d'insertion en milieu de travail de nouveaux équipements visant à réduire l'exposition. C'est donc un outil pour quantifier l'exposition qui peut être très utile en hygiène du travail.

Toutefois, notre travail sur la biosurveillance individuelle apporte également un indice sur le développement optimal de la stratégie de biosurveillance populationnelle. Aussi, selon McCreddin *et al.* (2015), l'utilisation de la technique d'échantillonnage aléatoire à partir de distributions statistiques de concentrations d'exposition de particules de l'air chez des travailleurs offre une prédiction individuelle d'exposition appréciable, basée sur trois mesures statistiques (pour 255 échantillons provenant de 59 travailleurs). Il serait intéressant de réaliser une analyse similaire pour l'exposition aux pyréthrinoïdes.

## **6.3. Contribution en analyse et gestion du risque relié aux pyréthrinoïdes chez les travailleurs agricoles**

Comme Paustenbach et Galbraith (2006) le mentionnent, les données scientifiques brutes obtenues lors d'études de biosurveillance sont insuffisantes pour être en mesure d'interpréter directement le risque associé et les résultats sont souvent contextuels. Toutefois, ces données sont essentielles à la santé publique. Une documentation plus rigoureuse de l'exposition et/ou des mesures entreprises pour limiter cette exposition serait souhaitable pour la continuité des projets de biosurveillance. Nous avons renforcé la connaissance des données toxicocinétiques temporelles afin d'évaluer les données de biosurveillance et avons pu remettre en contexte l'exposition.

Pour la population générale, l'alimentation est la principale source d'exposition. Il ne faut toutefois pas oublier que la consommation des fruits et légumes est essentielle et offre plus de bénéfices que de risque, on ne doit pas limiter notre consommation de fruits et légumes. D'ailleurs les auteurs Reiss *et al.* (2012) confirment que la présence potentielle de pesticides dans les fruits et légumes n'est pas associée à un risque assez élevé pour la santé pour justifier la diminution de la consommation de ces aliments en fonction de leurs bénéfices pour la santé (Reiss *et al.*, 2012). Lors d'une exposition professionnelle, l'alimentation n'est toutefois généralement pas la source principale d'exposition aux pyréthrinoïdes.

Lors du volet terrain chez les travailleurs, les responsables des entreprises agricoles ont soulevé que la cyalothrine (Matador) remplace tranquillement la perméthrine et cyperméthrine à cause de sa plus grande persistance dans l'environnement et que l'utilisation de la perméthrine et cyperméthrine va diminuer lentement pour être remplacée par celle d'autres pyréthrinoïdes. Il est difficile d'évaluer l'étendue de ce changement et les ventes actuelles ne reflètent pas cette situation. L'important pour réduire l'exposition chez les travailleurs est le port d'équipement de protection et de bonnes pratiques d'hygiène. Les données de

biosurveillance refléteront alors les mesures entamées en gestion du risque. Au Québec, le Centre de référence en agriculture et agroalimentaire du Québec (CRAAQ) a élaboré une base de données nommée SAgE pesticides qui est un «*outil d'information sur les risques pour la santé et l'environnement ainsi que sur les usages agricoles pour une gestion rationnelle et sécuritaire des pesticides au Québec*». Un équipement de protection individuelle (EPI) est recommandé pour chaque type de pesticides et de tâche. Il inclut généralement des bottes imperméables, des vêtements de protection cutanée (VPC) et respiratoire et des gants imperméables (Sage, 2014a). Dans le cas des applicateurs, des lunettes et un masque sont souvent conseillés (Sage, 2014a). Cependant, selon nos résultats, les applicateurs ne portent pas tous les équipements suggérés; la protection pourrait être améliorée.

Dans l'étude de Panuwet *et al.* (2008), 85% des travailleurs agricoles portaient des manches ou pantalons longs et seulement 10% des travailleurs portaient un équipement de protection imperméable adéquat, ce qui est une situation fort différente de la situation actuelle en contexte québécois. Dans le cas présent de la problématique associée aux insecticides pyréthrinoïdes, on se questionne sur sa gestion du risque. Doit-on revoir les normes afin de diminuer l'exposition? Doit-on investir sur le développement d'insecticides plus sécuritaires? Peut-on proposer une valeur de mesure biologique de l'exposition qui représente réellement le risque? Plusieurs questions restent sans réponse précise. Toutefois, améliorer l'interprétation et les stratégies de biosurveillance, comme cette thèse avait pour objectif, permettrait de mesurer entre autres l'efficacité des mesures de protection. La relation entre les facteurs environnementaux et la qualité de vie des populations n'est plus à démontrer. La santé était auparavant une préoccupation individuelle; c'est désormais une question de préoccupation collective. Le gouvernement a un rôle d'encadrement, de sensibilisation, voir de réglementation afin d'assurer le bien-être de sa population. L'établissement de normes et l'encadrement environnemental sont alors des enjeux cruciaux et des données de biosurveillance en contexte québécois aident les instances à se positionner par rapport à cette situation.

## 6.4. Perspectives

### 6.4.1. Modélisation des données toxicocinétiques

L'analyse de risque en santé environnementale repose sur l'évaluation de données de biosurveillance. Il y a une nécessité d'établir des outils tels que des modèles toxicocinétiques pour relier les doses d'exposition aux doses absorbées estimées par les niveaux de biomarqueurs d'exposition peu importe le scénario d'exposition. La modélisation est réalisée par l'ajustement d'équations mathématiques à des données expérimentales, afin de reproduire le profil temporel des molécules dans des matrices biologiques. Cette approche de modélisation requiert d'avoir des données expérimentales fiables sur le profil temporel des molécules d'intérêts dans différentes matrices biologiques afin de construire les modèles. L'étude toxicocinétique de certains insecticides, dont la deltaméthrine (Mirafazaelian *et al.*, 2006), la perméthrine (Tomalik-Scharte *et al.*, 2005) et la cyfluthrine (Leng *et al.*, 1997a), a été rapportée. Toutefois, ces données sont très limitées et ne permettent actuellement pas de construire un modèle fiable. La plupart des données toxicocinétiques proviennent d'expérimentations sur les animaux. Un modèle toxicocinétique de la perméthrine a aussi été publié par d'autres auteurs (Tornero-Velez *et al.*, 2012). Toutefois, ces derniers reconnaissent le manque d'informations et les incertitudes dans le modèle reliées à la fréquence, à la durée et au coefficient d'absorption ainsi qu'aux nombreuses voies d'exposition. D'ailleurs, un modèle toxicocinétique développé par l'équipe de recherche (Côté *et al.*, 2014), voulant reconstituer l'exposition à la perméthrine et cyperméthrine, a mis en évidence le manque de données toxicocinétiques chez l'humain dans le sang et l'urine et le manque d'information sur la variabilité inter-individuelle présente chez les travailleurs. Un bon modèle toxicocinétique devrait permettre de reconstruire la dose d'exposition en prenant en compte plus d'un biomarqueur d'exposition, en l'occurrence le 3-PBA, *cis*-DCCA et *trans*-DCCA pour les pyréthrinoïdes comme la perméthrine et cyperméthrine. Aussi, comme les profils d'élimination du *cis*-DCCA, *trans*-DCCA et 3-PBA sont légèrement différents, les ratios DCCA/3-PBA apporteraient des indices sur le type de source (type de précurseur mère, types de voies d'exposition); le ratio d'isomères informerait aussi sur le temps depuis l'exposition.

Les publications sur la modélisation ont mis en évidence le manque d'informations toxicocinétiques humaines (Côté *et al.*, 2014), ce que la présente recherche vient pallier.

#### **6.4.2. Étude de l'exposition chronique chez l'humain**

Narendra *et al.* (2008) ont effectué une étude sur les effets des pyréthrinoïdes lors d'utilisation de solutions de répulsifs à insectes chez des volontaires et ont pu observer des changements biochimiques notables et des dérangements du métabolisme. Cependant, ils précisent le manque d'informations sur l'exposition chronique de ces composés et l'importance d'études approfondies. En effet, peu d'études de toxicité chez l'humain exposé à de faibles niveaux mais de façon chronique ont été publiées. La recherche de biomarqueurs d'effets informe sur des altérations biologiques précoces associés à une exposition. Lors d'exposition faible ne produisant pas de symptômes ou d'effets néfastes observables, c'est une avenue intéressante pour identifier s'il y a des modifications précoces. Le domaine de la métabolomique est novateur et comme notre étude montre une modulation d'une protéine précurseur des indicateurs d'effets néfastes rénaux potentiels, davantage de recherches ciblées sur ce type d'effets rénaux devraient être conduites. Un projet de recherche en ce sens pourrait éventuellement reposer sur deux étapes : i) corrélérer les données de biosurveillance et les biomarqueurs d'effets métabolomiques dans une étude avec un effectif plus large; ii) réaliser une étude épidémiologique transversale pour tenter d'associer des effets rénaux néfastes et l'exposition potentielle pour certains sous-groupes les plus à risque.

#### **6.4.3. Études des mélanges**

Étant donné que les milieux agricoles sont des milieux complexes d'exposition à plusieurs types de composés xénobiotiques ayant souvent un fort indice de toxicité, dont pesticides et engrais, des études sur les mélanges environnementaux devraient être réalisées. Il est déjà connu qu'en présence de chlorpyrifos, l'hydrolyse de la *trans*-perméthrine peut être inhibée (Hodgson et Rose, 2005). La toxicocinétique et également la toxicité de la *trans*-perméthrine seraient alors modifiées. Aussi, le métabolisme des pyréthrinoïdes semble catalysé surtout par le cytochrome humain CYP2C19 (Scollon *et al.*, 2009), qui est une enzyme métabolisant



également le parathion et le diazinon (Ellison *et al.*, 2011). Le risque d'interactions en condition d'exposition professionnelle devrait être davantage étudié afin d'évaluer les conséquences toxicocinétiques et toxiques découlant de la co-exposition à ces mélanges.

## **6.5. Conclusion**

Le nombre annuel de publications concernant les insecticides pyréthrinoïdes montre que le sujet est une problématique reconnue par les scientifiques. Près de 4000 études portant sur les pyréthrinoïdes ont été publiées l'année dernière. Les publications des dernières années ont montré un manque d'informations concernant la toxicocinétique chez l'humain et le suivi temporel de biomarqueurs d'exposition tout en reflétant le manque d'informations concernant les stratégies de biosurveillance ou la caractérisation d'exposition professionnelle québécoise. Cette présente thèse a atteint ses objectifs de départ en répondant aux questions initiales soulevées. Les données actuelles serviront à raffiner l'estimation de l'analyse de risque ainsi que les approches de biosurveillance afin de travailler à l'amélioration de la santé publique.





## Références

Alonso, P.L., Tanner, M. (2013). Public health challenges and prospects for malaria control and elimination. *Nature Medicine*, 19:150–155.

Amhed, S.R. (2000). The immune system as a potential target for environmental estrogens (endocrine disruptors): a new emerging field. *Toxicology*, 150 (1-3): 191-206.

Anadon, A., Martinez-Larranaga, M.R., Diaz, M.J., Bringas, P. (1991). Toxicokinetics of permethrin in the rat. *Toxicology Applied Pharmacology*, 110(1): 1-8.

Angerer, J., Ritter, A., (1997). Determination of metabolites of pyrethroids in human urine using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography B*, 695:217-226.

Ansari, R.W., Shukla, R.K., Yadav, R.S., Seth, K., Pant, A.B., Singh, D., *et al.* (2012). Cholinergic dysfunctions and enhanced oxidative stress in the neurobehavioral toxicity of lambda-cyhalothrin in developing rats. *Neurotoxicology Research*, 22:292-309.

Arcury, T.A., Quandt, S.A. (2003). Pesticides at work and at home: exposure of migrant farmworkers and their families. *Lancet*, 362:2021.

Arcury, T.A., Quandt, S.A., Barr, D.B., Hoppin, J.A., McCauley, L., Grzywacz, J.F., *et al.* (2006). Farmworker exposure to pesticides: methodologic issues for the collection of comparable data. *Environmental Health Perspectives*, 114(6):923-928.

Arcury, T.A., Grzywacz, J.G., Isom, S., Whalley, L.E., Vallejos, Q.M., Chen, H., *et al.* (2009). Seasonal variation in the measurement of urinary pesticide metabolites among latino farmworkers in eastern north Carolina. *International Journal of occupational and environmental health*, 15:339-350.

Arrebola, F.J., Martínez-Vidal, A., Fernández-Gutiérrez, M., Akhtar M.H. (1999). Monitoring of pyrethroid metabolites in human urine using solid-phase extraction followed by gas chromatography- tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 401(1-2):45-54.

ATSDR, (2003). Toxicological profile for pyrethrins and pyrethroids. US Department of health and human services. 287 pages. Consulté en ligne le 2014-03-27, au: [www.atsdr.cdc.gov/toxpro2.html](http://www.atsdr.cdc.gov/toxpro2.html).

ATSDR (2005). Public Health Assessment Guidance Manual. Appendix G: Calculating Exposure Doses. Consulté en ligne le 2014-09-17, au: <http://www.atsdr.cdc.gov/hac/PHAManual/appg.html>

Barr, D.B., Thomas, K., Curwin, B., Landsittel, D., Raymer, J., Lu, C., *et al.* (2006). Biomonitoring of exposure in farmworker studies. *Environmental health perspectives*, 114 (6):936-942.

Barr, D.B., Leng, G., Berger-Preiss, E., Hoppe, H.W., Weerasekera, G., Gries, W., *et al.* (2007). Cross validation of multiple methods for measuring pyrethroid and pyrethrum insecticide metabolites in human urine. *Anal Bioanalytical Chemistry*, 389(3):811-818.

Barr, D.B., Olsson, A., Wong, L.Y., Udunka, S., Baker, S.E., Whitehead, R.D., *et al.* (2010). Urinary concentrations of metabolites of pyrethrinoid insecticides in the general US population: national health and nutrition examination survey 1999-2002. *Environmental health perspectives*, 118(6):742-748.

Beger, R.D., Sun, J., Schnackenberg, L.K. (2010). Metabolomics approaches for discovering biomarkers of drug-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity. *Toxicology and applied pharmacology*, 243:154-166.

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. *Annals Of Occupational Hygiene*, 56 (7):815-828,

Bloomquist, J.R. (1993). Neuroreceptor mechanisms in pyrethroids mode of action and resistance. In: Roe, M, Kuhr RJ eds, *Reviews in pesticide toxicology. Toxicology communications*, Raleigh, NC, pp.181-226.

Bloomquist, J.R. (2013). Insecticides: Chemistries and Characteristics. In: E. B. Radcliffe, W. D. Hutchison & R. E. Cancelado [eds.], *Radcliffe's IPM World Textbook*, URL: <http://ipmworld.umn.edu>, University of Minnesota, St. Paul, MN.

Bonvallot, N., Tremblay-Franco, M., Chevrier, C., Canlet, C., Warembourg, C., Cravedi, J.P. *et al.* (2013). Metabolomics tools for deciphering complex pesticide exposure in pregnant women in Brittany (France). *Metabolomics and multiple pesticides exposure*, 8(5):1-9.

Bouchard, M. (2010). Protocole de demande de subvention à l'IRSST. Développement et application d'une approche pour l'Évaluation de l'exposition des travailleurs agricoles aux pyréthriinoïdes, 36 pages.

Bouvier, G., Seta, N., Vigouroux-Villard, A., Blanchard, O., Momas, L. (2005). Insecticide urinary metabolites in nonoccupationally exposed populations. *Journal of toxicology and environmental health, part B*, 8:485-512.

Bradberry, S.M., Cage, S.A., Proudfoot, A.T., Vale, J.A. (2005). Poisoning due to Pyrethroids. *Toxicological Reviews*, 24 (2):93-106.

Bradman, A., Salvatore, A.L., Boeniger, M., Castorina, R., Snyder, J., Barr, D.B., Jewell, N.P., Kavanagh-Baird, G., Striley, C., Eskenazi, B. (2008). Community-based intervention to reduce pesticide exposure to farmworkers and potential take-home exposure to their families. *J Expo Sci Environ Epidemiol* pp: 1-11.

Brady, T., West, M.A. (2009). Analysing longitudinal data with the linear mixed models procedure in SPSS. *Evaluation & the health professions*, 32(3):207-228.

Carlock, L.L., Chen, W.L., Gordon, E.B., Killeen, J.C., Manley, A., Meyer, L.S. *et al.* (1999). Regulating and assessing risks of cholinesterase-inhibiting pesticides: divergent approaches and interpretations. *Journal of Toxicology Environmental Health B*, 2:105–160.

Carey, Francis A. (2006). Spectroscopy by Ian Hunt and Rick Spinney. In *Organic chemistry*. McGraw-Hill College; 6th edition, 1335 pages

Carriquiriborde, P., Marino, D.J., Giachero, G., Castro, E.A., Ronco, A.E. (2012). Global metabolic response in the bile of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*, Pisces) sublethally exposed to the pyrethroids cypermethrin. *Ecotoxicology and environmental safety*, 76:46-54.

CDC (2009). Fourth national report on human exposure to environmental chemicals. Atlanta (GA). Center for Disease Control and Prevention, 529 pages. Consulté en ligne le 2013-07-07 au : <http://www.cdc.gov/exposurereport/pdf/FourthReport.pdf>

Chauhan, R., Kumari, B., Rana, M.K. (2014). Effect of fruit and vegetable processing on reduction of synthetic pyrethroid residues. *Review Environmental Contamination Toxicology*, 229:89-110.

Chen, H., Xiao, J., Hu, G., Zhou, J., Xiao, H., Wang, X. (2002). Estrogenicity of organophosphorus and pyrethroid pesticides. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues*, 65(19): 1419 – 1435.

Chen, S., Zhang, Z., He, F., Yao, P., Wu, Y., Sun, J., Liu, L., Li, Q. (1991). An epidemiological study on occupational acute pyrethroid poisoning in cotton farmers. *British journal of industrial medicine*, 48:77-81.

Choi, J., Rose, R.L., Hodgson, E. (2002). In vitro human metabolism of permethrin: the role of human alcohol and aldehyde dehydrogenases. *Pesticides Biochemistry and Physiology*, 73:117-128.



Clark, J.M. (1995). Effects and mechanisms of action of pyrethrin and pyrethroid insecticides. In Handbook of Neurotoxicology, L.W. Chang, R.S. Dyer (Eds.), Marcel Dekker Inc, New York, pp. 511.

CIRC (2014). Monographie. Page consultée en ligne le 2014-06-18, au : <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsAlphaOrder.pdf>

Columé, A., Cardenas, S., Gallego, M., Valcarcel, M. (2001). A solid phase extraction method for the screening and determination of pyrethroids metabolites and organochlorine pesticides in human urine. Rapid communication mass spectrometry, 15:2007-2013.

Corrion, M.L., Ostrea, E.M.J., Bielawski, D.M., Posecion, N.C.J., Seagraves, J.J. (2005). Detection of prenatal exposure to several classes of environmental toxicants and their metabolites by gas chromatography-mass spectrometry in maternal and umbilical cord blood. Journal of Chromatography B. Volume 822(1):221-228.

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):1-14.

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 Montérégie area, Quebec, Canada. Journal of Occupational and Environmental Hygiene, 6(6):341-351.

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. Toxicology and Applied Pharmacology, 221(1):1-12.

Crawford, M.J., Croucher, A., Hutson, D.H. (1981). Metabolism of cis- and trans-cypermethrin in rats. Balance and tissue retention study. Journal Agriculture food chemistry, 29 (1):130-135.

Dilek, F., Muranli, G. (2013). Genotoxic and cytotoxic evaluation of pyrethroid insecticides  $\lambda$ -cyhalothrin and  $\alpha$ -cypermethrin on human blood lymphocyte culture. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 90:357-363.

Dumas, M.E. (2012). Metabolome 2.0: quantitative genetics and network biology of metabolic phenotypes. *Molecular and Biological System*, 8:2494-502.

Dzurik, R., Spustova, V., Krivosikova, Z., Gazdikova, K. (2001). Hippurate participates in the correction of metabolic acidosis. *Kidney International*, 59, suppl 78: S-278-281.

Eadsforth, C.V., Bragt, P.C., van Sittert, N.J. (1988). Human dose-excretion studies with pyrethroid insecticides cypermethrin and alphacypermethrin: relevance for biomonitoring. *Xenobiotica*, 18: 603-614.

Elflein, L., Berger-Preiss, E., Preiss, A., Elend, M., Levsen, K., Wünsch, G. (2003). Human biomonitoring of pyrethrum and pyrethroid insecticides used indoors: Determination of the metabolites E-cis/trans-chrysanthemumdicarboxylic acid in human urine by gas chromatography-mass spectrometry with negative chemical ionization. *Journal of Chromatography B*, 795(2):195–207

Elliott, M. (1989). The pyrethroids: early discovery, recent advances and the future. *Pesticides Science*, 27:337–351.

Ellison, C.A., Tian, Y., Knaak, J.B., Kostyniak, P.J., Olson, J.R. (2011). Human Hepatic Cytochrome P450-Specific Metabolism of the Organophosphorus Pesticides Methyl Parathion and Diazinon. *Drug Metabolism And Disposition*, 40 (1):1-5.

Emara, A.M., Draz, E.I. (2007). Immunotoxicological study of one of the most common over-the-counter pyrethroid insecticide products in Egypt. *Inhalation Toxicology*, 19(12): 997-1009.

Ferrer, I., Thurman, E.M. (2013). High Resolution Mass Spectrometry (LC/Q-TOF/MS) for the Detection of Pharmaceuticals in Water. *Center for Environmental Mass Spectrometry*,

Department of Environmental Engineering, University of Colorado Boulder, USA, 8 pages.  
Consulté en ligne le 25 mars 2015 au :  
<http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5991-3261EN.pdf>

Fiehn, O., Kopka, J., Dörmann, P., Altmann, T., Trethewey, R.N., Willmitzer, L. (2000).  
Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nature Biotechnology*, 11:1157-1161.

Fenske, R.A. (1988). Comparative assessment of protective clothing performance by  
measurement of dermal exposure during pesticide applications. *Applied Industrial hygiene*,  
3207- 3213.

Fenske, R.A. (1990). Nonuniform dermal deposition patterns during occupational exposure to  
pesticides. *Archives of Environmental Contamination Toxicology*, 19:332-337.

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.  
*Environmental Research*, 107: 343-350.

Fortin, M.C., Carrier, G., Bouchard, M. (2008b). Concentrations versus amounts of  
biomarkers in urine: a comparison of approaches to assess pyrethroids exposure.  
*Environmental health*, 7:2-13.

Fortin, M-C., Bouchard, M., Carrier, G. (2009). Comparison of the urinary excretion of  
biomarkers of exposure to pyrethroids and pyrethrins between residents of urban and rural  
areas of the Province of Quebec, Canada. *Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique*,  
57(6) :395-401.

Garrod, A.N.I., Phillips, A.M., Pemberton, J.A. (2000). Potential exposure of hands inside  
protective gloves—a summary of data from non-agricultural pesticide surveys. *The Annals of  
Occupational Hygiene*, 45(1):55-60.

Gaughan, L.C., Unai, T., Casida, J.E. (1977). Permethrin metabolism in rats. *Journal of  
Agricultural and Food Chemistry*, 25: 9-17.

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 metabolism and disposition*, 34:1764-1771.

Godin, S.J., Crow, J.A., Scollon, E.J., Hughes, M.F., DeVito, M.J., Ross, M.K. (2007). Identification of rat and human cytochrome P450 isoforms and a rat serum esterase that metabolize the pyrethroids insecticides deltamethrin and esfenvalerate. *Drug metabolism and disposition*, 35:1664-1671.

Gorse, I., Balg, C. (2013). Bilan des ventes de pesticides au Québec pour l'année 2010, Québec, Ministère du Développement durable, de l'Environnement, de la Faune et des Parcs, 85 p.

Gotoh, Y., Kawakami, M., Matsumoto, N., Okada, Y. (1998). Permethrin emulsion ingestion: clinical manifestation and clearance of isomers. *Clinical Toxicology*, 36:57-61.

Gouvernement du Québec (2014a), Loi sur la Santé publique. Site consulté en ligne le 2014-06-18 au : [http://www2.publicationsduquebec.gouv.qc.ca/dynamicSearch/telecharge.php?type=2&file=/S\\_2\\_2/S2\\_2.html](http://www2.publicationsduquebec.gouv.qc.ca/dynamicSearch/telecharge.php?type=2&file=/S_2_2/S2_2.html)

Gouvernement du Québec (2014b). Loi sur les pesticides. Consultée en ligne le 2014-06-18, au : [http://www2.publicationsduquebec.gouv.qc.ca/dynamicSearch/telecharge.php?type=2&file=/P\\_9\\_3/P9\\_3.htm](http://www2.publicationsduquebec.gouv.qc.ca/dynamicSearch/telecharge.php?type=2&file=/P_9_3/P9_3.htm)

Gouvernement du Québec (2014c). Code de gestion des pesticides. Consultée en ligne le 2014-06-18, au : [http://www2.publicationsduquebec.gouv.qc.ca/dynamicSearch/telecharge.php?type=3&file=/P\\_9\\_3/P9\\_3R1.HTM](http://www2.publicationsduquebec.gouv.qc.ca/dynamicSearch/telecharge.php?type=3&file=/P_9_3/P9_3R1.HTM)

Gueguen, Y., Mouzat, K., Ferrari, L., Tissandie, E., Lobaccaro, J.M.A., Batt, A.-M., *et al.* (2006). Cytochromes P450: xenobiotic metabolism, regulation and clinical importance. *Annales de Biologie Clinique*, 64 (6):535-548.

Guérin, M., Gosselin, P., Cordier, S., Viau, C., Quénel, P., Dewailly, E. (2003). Livre : Environnement et santé publique, fondements et pratiques. Editions Edisem, Canada, 1023 p.

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. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 206(2):93-102.

Hardt, J., Angerer, J. (2003). Biological monitoring of workers after the application of insecticidal pyrethroids. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 76(7):492-498.

Hernández-Moreno, D., Soler, F., Míguez, M.P., Pérez-López, M. (2010). Brain acetylcholinesterase, malondialdehyde and reduced glutathione as biomarkers of continuous exposure of tench, *Tinca tinca*, to carbofuran or deltamethrin. *Science of Total Environment*, 408:4976–4983.

Heudorf, U., Angerer, J. (2001). Metabolites of pyrethroid insecticides in urine specimens: current exposure in an urban population in Germany. *Environmental health perspectives*, 109(3):213-217.

Hines, C.J., Deddens, J.A., Striley, C.A., Biagini, R.E., Shemaker, D.A., Brown, K.K. (2003). Biological monitoring for selected herbicide biomarkers in the urine of exposed custom applicators : application of the mixed-effect models. *Annales of Occupational Hygiene*, 47(6):503-517.

Hodgson, E., Rose, R.L. (2005). Human metabolism and metabolic interactions of deployment-related chemicals. *Drug metabolism reviews*, 1:1-39.

Holmes, E., Nicholls, A.W., Lindon, J.C., Ramos, S., Spraul, M., Neidig, P., *et al.* (1998). Development of a model for classification of toxin-induced lesions using <sup>1</sup>H NMR spectroscopy of urine combined with pattern recognition. *NMR in biomedicine*, 11:235-244.

Holmes, E., Nicholls, A.W., Lindon, J.C., Connor, S.C., Polley, S., Connelly, J. (1998b). The identification of novel biomarkers of renal toxicity using automatic data reduction techniques and PCA of proton NMR spectra of urine. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 44: 245–255.

Holmes, E., Nicholls, A.W., Lindon, J.C., Connor, S.C., Connelly, J.C., Haselden, J.N., *et al.* (2000). Chemometric models for toxicity classification based on NMR spectra of biofluids. *Chemical Research in Toxicology*, 13: 471-478.

Hong, C.S., Ganetzky, B. (1994). Spatial and temporal expression patterns of two sodium channels genes in *Drosophila*. *Journal neuroscience*, 14:5160-5169.

Housset, P., Dickmann, R. (2009). A promise fulfilled – pyrethroid development and the benefits for agriculture and human health. *Bayer CropScience Journal*, 62(2):135-143.

INRS (2010). Pyrethrinoïdes de synthèse halogénés. Consulté en ligne le 2011-02-22, au : [http://www.inrs.fr/INRS-PUB/inrs01.nsf/IntranetObjectaccesParReference /BIO\\_SD\\_389 /\\$File/Visu.html](http://www.inrs.fr/INRS-PUB/inrs01.nsf/IntranetObjectaccesParReference/BIO_SD_389/$File/Visu.html)

INSPQ (2004). Substances chimiques avec indicateur biologique : seuils de déclaration par les laboratoires. Direction des risques biologiques, environnementaux et occupationnels, par Alain Leblanc, 24 pages.

INSPQ (2005). Centre de presse. Page consultée en ligne le 2011-02-22, au : <http://www.inspq.qc.ca/CentrePresse/communiqués.asp?NoCommunique=71&E=cp&Submit=1>

INSPQ (2012). Étude sur la présence de résidus chimiques dans les aliments consommés au Québec. Direction de la santé environnementale et de la toxicologie. 119 pages.

INSPQ, (2014). Nos 3 pôles d'expertise. Site consulté en ligne le 2014-06-18, au : <http://www.inspq.qc.ca/nos-trois-poles-d-expertise>

IRIS- EPA (1990). Cypermethrin (CASRN 52315-07-8). Page consultée en ligne le 2011-02-21, au : <http://www.epa.gov/iris/subst/0380.htm>

IRIS- EPA (1992). Permethrin (CASRN 52645-53-1). Page consultée en ligne le 2011-02-21, au : <http://www.epa.gov/iris/subst/0185.htm>

IRSST (2012). Études et recherches : guide technique T-03- Guide de surveillance biologique de l'exposition- Stratégie de prélèvement et interprétation des résultats, 7e édition. Truchon G, Tardif R, Lavoué J, Drolet D, Lévesque M, Boucher J. Montréal (Québec), 101 pages.

Issam, C., Samir, H., Zohra, H., Monia, Z., Hassen, V. (2009). Toxic responses to deltamethrin low doses on gonads, sex hormones and lipoperoxidation in male rats following subcutaneous treatments. *Journal Toxicology Science*, 34:663–670.

Kaneko, H., Miyamoto, J. (2001). Pyrethroid chemistry and metabolism. In *Handbook of Pesticide Toxicology*, Robert Krieger, Academic press, San Diego, 1263-1288.

Kaneko, H. (2010). Pyrethroid chemistry and metabolism, in: Kriedger, R. (Eds), Hayes' *Handbook of pesticide toxicology*. Academic Press, 1635-1663.

Kim, S.S., Lee, R.D., Lim, W.J., Kwack, S.J., Rhee, G.S., Seok, J.H., *et al.* (2005). Potential estrogenic and Antiandrogenic effects of permethrin in rats. *Journal of reproduction and development*, 51(2):201-210.

Kim, K.B., Anand, S.S., Kim, H.J., White, C.A., Bruckner, J.W. (2008). Toxicokinetics and tissue distribution of deltamethrin in adult Sprague–Dawley rats. *Toxicological sciences*, 101(2): 197–205.

Krug, S., Kastenmuller, G., Stuckler, F., Rist, M.J., Skurk, T., Sailer, M., *et al.* (2012). The dynamic range of the human metabolome revealed by challenges. *The FASEB journal*, 26:2607-2619.

Kühn, K.H., Leng, G., Bucholski, K.A., Dunemann, L., Idel, H. (1996). Determination of pyrethroid metabolites in human urine by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia*, 43(5-6):285-292.

Kühn, K.-H., Wieseler, B., Leng, G., Idel, H. (1999). Toxicokinetics of pyrethroid in humans: consequences for biological monitoring. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology*, 62:101-108.

Kuo, C.H., Wang, K.C., Tian, T.Z., Tsai, M.H., Chiung, Y.M., Hsieh, C.M., *et al.* (2012). Metabolomic characterization of laborers exposed to welding fumes. *Chemical research in toxicology*, 25:676-686.

Lafortune, M., Panisset, J.C. (1988). Mesure de risque d'exposition aux pesticides pour les producteurs agricoles du Québec. *Travail et santé*, 4(2) :S9-S14.

Lavado, R., Li, J., Rimoldi, J.M., Schlenk, D. (2014). Evaluation of the stereoselective biotransformation of perméthrine in human liver microsomes: contributions of cytochrome P450 monooxygenases to the formation of estrogenic metabolites. *Toxicology letters*, 226: 192-197.

Laurence, L.J., Casida, J.E. (1982). Pyrethroid toxicology: mouse intracerebral structure-toxicity relationships. *Pesticides Biochemistry Physiology*, 18:9-14.

Le Grand, R., Dulaurent, S., Gaulier, J.M., Saint-Marcoux, F., Moesch, C., Lachâtre, G. (2012). Simultaneous determination of five synthetic pyrethroids metabolites in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry : application to 39 persons without know exposure to pyrethroids. *Toxicology letters*, 210(2):248-253.

Leng, G., Kühn, K.H., Idel, H. (1996). Biological monitoring of pyrethroid metabolites in urine of pest control operators. *Toxicology Letters*, 88(1-3):215-220.



Leng, G., Leng, A., Kühn, K-H., Lewalter, J., Pauluhn, J. (1997a). Human dose-excretion studies with the pyrethroid insecticide cyfluthrin: urinary metabolite profile following inhalation. *Xenobiotica*, 27:1273-1283.

Leng, G., Kühn, K.H., Idel, H. (1997b). Biological monitoring of pyrethroids in blood and pyrethroid metabolites in urine: applications and limitations. *Science Total Environment*, 199 (1-2):173-181.

Leng, G., Gries, W., Selim, S. (2006a). Biomarker of pyrethrum exposure. *Toxicology Letters*, 162(2-3 Special Issue SI):195-201.

Leng, G., Gries, W. (2006b). Determination of pyrethroids in blood plasma and pyrethroids/perméthrine metabolites in urine by gas chromatography-mass spectrometry and high-resolution GC-MS. In: *Methods in biotechnology, vol 19, Pesticides protocols*. Edited by JL Martinez Vidal and A. Garrido Frenich, Humana Press inc, Totowa NJ, pp:17-33.

Lin, C.Y., Viant, M., Tjeerdema, R.S. (2006). Metabolomics: methodologies and applications in the environmental sciences. *Journal of Pesticide Science*, 31(3):245-251.

Liu, J., Litt, L., Segal, M.R., Kelly, M.J.S., Pelton, J.G., Kim, M. (2011). Metabolomics of oxidative stress in recent studies of endogenous and exogenously administered intermediate metabolites. *International journal of molecular sciences*, 12:6469-6501.

Lorenz, W., Bahadir, M., Korte, F. (1985). On the application of synthetic pyrethroids as wood preservatives: A contribution to reduce indoor chemical pollution. *European Journal of Wood and Wood Products*, 43(8):339-343.

MAPAQ- Ministère de l'agriculture, pêche et alimentation du Québec (2010). L'emploi bioalimentaire. Page consulté en ligne le 2013-03-23, au : <http://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/md/statistiques/Pages/emploi.aspx>

Matsuo, N., Mori, T. (2012). Pyrethroids-from chrysanthemum to modern industrial insecticide, In: *Topics in current chemistry*, Springer. NY, USA, 224 p.

McCreddin, A., Alam, M.S., McNabola, A. (2015). Modelling personal exposure to particulate air pollution: An assessment of time-integrated activity modelling, Monte Carlo simulation & artificial neural network approaches. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 218(1) :107-116.

McKelvey, W., Jacobson, B., Kass, D., Barr, D.B., Davis, M., Calafat, A.M., Aldous, K.M. (2013). Population based biomonitoring of exposure to organophosphate and pyrethroid pesticides in New York City. *Environmental health perspectives*, 121(11-12): 1349-1356.

MDDELCC (2014). Fiche-perméthrine. Page consultée en ligne le 2014-07-10, au : <http://www.mddelcc.gouv.qc.ca/pesticides/virus-nil/fiche-permethrine.pdf>

MDDEP (2012). Bilan des ventes de pesticides au Québec pour l'année 2009. Québec, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, ISBN 978-2-550-64375-3, 85 p.

MDDEP (2014). Toxicité relative des principaux ingrédients actifs contenus dans les pesticides d'usage commercial utilisés dans les espaces verts. 32 pages

Meeker, J.D., Barr, D.B., Hausser, R. (2008). Human semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary metabolites of pyrethroids insecticides. *Human reproduction*, 23 (8):1932-1940.

Meeker, J.D., Barr, D.B., Hausser, R. (2009). Pyrethroid insecticide metabolites are associated with serum hormone levels in adult men. *Reproductive Toxicology*, 27:155-160.

Meinking, T.L., Taplin, D. (1996). Safety of permethrin vs lindane for the treatment of scabies. *Archives of Dermatology*, 132:959–962.

Mirfazaelian, A., Kim, K-B., Anand, S.S., Kim, H.J., Tornero-Velez, R., Bruckner, J.V., *et al.* (2006). Development of a physiologically based pharmacokinetic model for deltamethrin in the adult Sprague-Dawley rat. *Toxicology Science*, 93: 432–442.

Morgan, M.K. (2012). Children's exposures to pyrethroid insecticides at home: a review of data collected in published exposure measurement studies conducted in the United States. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 9(8):2964-2985.

Narendra, M., Kavitha, G., Helah Kiranmai, A., Raghava Rao N., Varadacharyulu. N.C. (2008). Chronic exposure to pyrethroid-based allethrin and prallethrin mosquito repellents alters plasma biochemical profile. *Chemosphere*, 73:360–364.

Nishi, K., Huang, H., Kamita, S.G., Kim, I.H., Morisseau, C. *et al.* (2006). Characterization of pyrethroid hydrolysis by the human liver carboxylesterases hCE-1 and hCE-2. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 445:115-123.

Nordberg, G.F. (2010). Biomarkers of exposure, effects and susceptibility in humans and their application in studies of interactions among metals in China. *Toxicology Letters*, 192:45–49.

Normandin L., Bouchard, M., Ayotte, P., Blanchet, C., Becalski, A., Bonvalot, Y., *et al.* (2013). Dietary exposure to acrylamide in adolescents from a Canadian urban center. *Food Chem Toxicol.* 57:75-83.

Núñez, O., Moyano, E., Galceran, M.T. (2004). High mass accuracy in-source collision-induced dissociation tandem mass spectrometry and multi-step massspectrometry as complementary tools for fragmentation studies of quaternary ammonium herbicides. *Journal of Mass Spectrometry.* 8:873-883.

Olsson, A.O., Baker, S.E., Nguyen, J.V., Romanoff, L.C., Udunka, S.O., Walker, R.D., *et al.* (2004). A liquid chromatography tandem mass spectrometry multiresidue method for quantification of specific metabolites of organophosphorus pesticides, synthetic pyrethroids, selected herbicides and DEET in human urine. *Analytical chemistry*, 76:2453-2461.

OMS (1990) Environmental Health Criteria 97—Deltamethrin. International programme on chemical safety. World Health Organization, Geneva, Switzerland, pp 1–133

OMS (2005). Safety of pyrethroids for public health use. Communicable disease control, prevention and eradication. 69 p.

OMS (2011). Biomarkers & human biomonitoring. Children's Health and the Environment. WHO Training Package for the Health Sector, 1-35.

OMS (2014a). Environmental health. Site consulté en ligne le 2014-06-18, au : [http://www.who.int/topics/environmental\\_health/en/](http://www.who.int/topics/environmental_health/en/)

OMS (2014b). Santé publique et environnement. Site consulté en ligne le 2014-06-18, au : [http://www.who.int/phe/about\\_us/fr/](http://www.who.int/phe/about_us/fr/)

Oulhote, Y., Bouchard, M.F. (2013). Urinary metabolites of organophosphate and pyrethroids pesticides and behavioral problems in Canadian children. *Environmental health perspectives* 121(11-12):1378-1384.

Panuwet, P., Prapamontol, T., Chantara, S., Thavornyuthikarn, P., Montesano, M.A., Whitehead, R.D., *et al.* (2008). Concentrations of urinary pesticide metabolites in small-scale farmers in Chiang Mai province, Thailand. *Science of Total Environment*, 407(1):655-668.

Pauluhn, J. (1997). Risk assessment of pyrethroids following indoor use. *Toxicology Letters*, 88: 339-348.

Paustenbach, D., Galbraith, D. (2006). Biomonitoring and Biomarkers: Exposure Assessment Will Never Be the Same. *Environmental Health Perspectives*, 114(8): 1143-1149.

Peugh, J.L., Enders, C.K. (2005). Using the SPSS mixed procedure to fit cross-sectional and longitudinal multilevel models. *Educational and psychological measurement*, 65(5) :717-741.

Qi, X., Zheng, M., Wu, C., Chang, X., Wang, G., Lu, D., *et al.* (2011). Impact of prenatal pyrethroids exposure on neurodevelopment of one-year old infants. *Journal of hygiene research*, 40(6): 693-697.

Radio-Canada (2014). Des liens entre les pesticides et l'autisme? Édition du lundi 23 juin 2014. Consulté en ligne le 2014-07-01 au : <http://ici.radio-canada.ca/nouvelles/science/2014/06/23/001-etude-autisme-pesticides.shtml>

Ratelle, M., Côté, J., Bouchard, M. (2015a). Toxicokinetics of permethrin biomarkers of exposure in orally exposed volunteers. *Toxicology Letter*, (2):369-375.

Ratelle, M., Côté, J., Bouchard, M. (2015b). Time profiles and toxicokinetic parameters of key biomarkers of exposure to cypermethrin in orally exposed volunteers compared with previously available kinetic data following permethrin exposure. *Journal of Applied Toxicology*, 35(5), doi: 10.1002/jat.3124.

Reiss, R., Johnston, J., Tucker, K., DeSesso, J.M., Keen, C.L. (2012). Estimation of cancer risks and benefits associated with a potential increased consumption of fruits and vegetables. *Food and Chemical Toxicology*, 50:4421-4427.

Renwick, A.G. (2008). Toxicokinetics, in *Principles and Methods of Toxicology*, Fifth Edition. by A. Wallace Hayes (eds) at Informa Health Care, New York, USA, 179-230.

Ross, M.K., Borazjani, A., Edwards, C.C., Potter, P.M. (2006). Hydrolytic metabolism of pyrethroids by human and other mammalian carboxylesterases. *Biochemistry Pharmacology*, 71(5):657-669.

Sage pesticide (2014a). Outil d'information sur les risques pour la santé et l'environnement ainsi que sur les usages agricoles pour une gestion rationnelle et sécuritaire des pesticides au Québec. Site consulté le 2014-06-23 au : <http://www.sagepesticides.qc.ca/>

Sage pesticides (2014b). Effets toxiques des matières actives- cyperméthrine. Page consultée en ligne le 2014-07-10, au : <http://www.sagepesticides.qc.ca/Recherche/resultats.aspx?Search=matiere&ID=116>

Sage pesticides (2014c). Effets toxiques des matières actives- perméthrine. Page consultée en ligne le 2014-07-10, au :<http://www.sagepesticides.qc.ca/Recherche/Resultats.aspx?search=matiere&ID=153>

Sakr, S.A., Avab, A.E. (2001). Effect of pyrethroids inhalation on the testis of albino rat. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 4(4):498-500.

Sams, C., Jones, K. (2012). Biological monitoring for exposure to deltamethrin: A human oral dosing study and background levels in the UK general population. *Toxicology letters*, 213:35-38.

Santé Canada (2011). Pest control products sales report for 2011. Gouvernement du Canada, 45 pages.

Santé Canada (2012). Limite maximale de résidus (LMR)- Base de données. Sites consulté en ligne le 2014-07-04, au : <http://pr-rp.hc-sc.gc.ca/mrl-lrm/index-fra.php>

Santé Canada (2013). Deuxième rapport sur la biosurveillance humaine des substances chimiques de l'environnement au Canada- Résultats de l'Enquête canadienne sur les mesures de la santé Cycle 2 (2009 à 2011). Gouvernement du Canada, 446 p.

Schettgen, T., Heudorf, U., Drexler, H. Angerer, J. (2002a). Pyrethroid exposure of the general population—is this due to diet. *Toxicology Letters*, 134(1-3):141-145.

Schettgen, T., Koch, H.M., Drexler, H. Angerer, J. (2002b). New gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of urinary pyrethroids metabolites in environmental medicine. *Journal of chromatography B*, 778:121-130.

Schünemann, H., Hill, S., Guyatt, G., Akl, E. A., & Ahmed, F. (2011). The GRADE approach and Bradford Hill's criteria for causation. *Journal of epidemiology and community health*, 65(5):392-395.

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 Metabolism and Disposition*, 37(1):221-228.

Shekm D.T.L., Ma, C.M.S. (2011). Longitudinal data analyses using linear mixed model in SPSS : concepts, procedures and illustrations. *The scientific world Journal*, 11 :42-76.

Shelton, J.F., Geraghty, E.M., Tancredi, D.J., Delwiche, L.D., Schmidt, R.J., Ritz, B., *et al.* (2014). Neurodevelopmental Disorders and Prenatal Residential Proximity to Agricultural Pesticides: The CHARGE Study. *Environmental Health Perspectives*, 1-29, <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1307044>

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. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 23(2):207-216.

Silverstein, R.M., Webster, F.X., Kiemle, D.J. (2005). Proton NMR spectrometry. In: *Spectrometric identification of organic compounds*, 7e ed. John Wiley and sons, Danvers, USA, 550 pages, pp: 127-204.

Sinha, C., Seth, K., Islam, F., Rajnish, K., Chaturvedi, S., Shukla, N.M. *et al.* (2006). Behavioral and neurochemical effects induced by pyrethroid-based mosquito repellent exposure in rat offsprings during prenatal and early postnatal period. *Neurotoxicology and teratology*, 28 (4):472-481.

Soderlund, D.M., Knipple, D.C. (1995). Actions of insecticides on sodium channels: multiple target sites and site-specific resistance. In: Clark JM eds, *Molecular action of insecticides on ion channels*. American chemical society, Whashington, DC, 97-108.

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.

SPSS (2002). Linear mixed effects modeling in SPSS, an introduction to the mixed procedure-technical report. Chicago, USA, 26 pages.

Spurlock, F., Lee, M. (2008). Chapter 1 : Synthetic Pyrethroid Use Patterns, Properties and Environmental Effects. In: Environmental Monitoring Branch, California Department of Pesticide Regulation, 10011 Street, Sacramento, CA 95812-4015.

Tisch, M., Schmezer, P., Faulde, M., Groh, A., Maier, H. (2002). Genotoxicity studies on permethrin, DEET and diazinon in primary human nasal mucosal cells. *Europe Archives Otorhinolaryngology*, 259:150–153.

Thiphom, S., Prapamontol, T., Chantara, S., Mangklabruks, A., Suphavitai, C., Ahn, K.C., *et al.* (2014). Determination of the pyrethroid insecticide metabolite 3-PBA in plasma and urine amples from farmer and consumer groups in northern Thailand. *Journal of environmental science and health, part B*, 49:15-22.

Thomson, A.H. (2000). Introduction to Clinical Pharmacokinetics. *Paediatric and Perinatal Drug Therapy* 4 (1): 3-11.

Tomalik-Scharte, D., Lazar, A., Meins, J., Bastian, B., Ihrig, M., Wachall, B., *et al.* (2005). Dermal absorption of permethrin following topical administration. *Europe Journal of Clinical Pharmacology*, 61:399-404.

Tornero-Velez, R., Davis, J., Scollon, E.J., Starr, J.M., Stezer, 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. *Toxicological sciences*, 130(1):33-47.

Trunnelle, K.J., Bennett, D.H., Ahn, K.C., Schenker, M.B., Tancredi, D.J., Gee, S.J., *et al.* (2014). Concentrations of the urinary pyrethroids metabolite 3-phenoxybenzoic acid in farm worker families in the MICASA study. *Environmental research*, 131:153-159.



University of Hertfordshire (2013). The Pesticide Properties DataBase (PPDB) developed by the Agriculture & Environment Research Unit (AERU), University of Hertfordshire, 2006-2013. Page consultée en ligne au: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/fr/Reports/197.htm>

US. EPA (1998). The human health risk assessment process and FQPA. Consulté en ligne le 2014-09-18, au: <http://www.epa.gov/oppfead1/trac/2umbrel.htm>

US. EPA (2000). Science policy on the use of data on cholinesterase inhibition for risk assessments of organophosphorous and carbamate pesticides. Office of Pesticide Programs. Washington DC, 51 pages.

US. EPA (2006). Reregistration eligibility decision (RED) for cypermethrin. U.S. Environmental Protection Agency, Prevention, Pesticides and Toxic Substances, EPA OPP-2005-0293.

US. EPA (2008). EPA's records disposition schedule PEST 361 scientific data reviews HED records center - Permethrin: estimated dermal absorption factor in human. U.S. Environmental Protection Agency, Prevention, Pesticides and Toxic Substances, 16 pages..

US. EPA (2009). Reregistration eligibility decision (RED) for permethrin. U.S. Environmental Protection Agency, Prevention, Pesticides and Toxic Substances, EPA 738-R-06-017.

US. EPA (2013). Pesticides: regulating pesticides, pyrethroids and pyrethrins. Consulté en ligne le 2014-06-18, au: <http://www.epa.gov/oppsrrd1/reevaluation/pyrethroids-pyrethrins.html>

US. EPA (2014a). Defining Biomarkers. Page consulté en ligne le 2014-07-10, au: <http://www.epa.gov/pesticides/science/biomarker.html>

US. EPA (2014b). Environmental justice. Consulté en ligne le 2014-09-17, au: <http://www.epa.gov/environmentaljustice/>

Vadhana, M.S.D., Nasuti, C., Gabbianelli, R. (2010). Purine bases oxidation and repair following permethrin insecticide treatment in rat heart cells. *Cardiovascular Toxicology*, 10:199–207.

Van der Rhee, H.J., Farquhar, J.A., Vermeulen, N.P. (1989) Efficacy and transdermal absorption of permethrin in scabies patients. *Acta Dermato-Venereologica*, 69:170–171.

Vermeulen, R., Stewart, P., Kromhout, H. (2002). Dermal exposure assessment in occupational epidemiologic research. *Scandinavian Journal of Work Environmental Health*, 28:371-385.

Viau, C., Lafontaine, M., Payan, J.P. (2004). Creatinine normalization in biological monitoring revisited : the case of 1-hydroxypyrene. *International Archives of Occupational and Environmental health*, 77:177-185.

Voigtman, E. (2008). Limits of detection and decision, part 4. *Spectrochimica Acta Part B*, 63(2):154-165.

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. *Journal of Occupational Health*, 49(6):509-514.

Wang, J., Zhu, Y., Cai, X., Yu, J., Yang, X., Cheng, J. (2011). Abnormal glucose regulation in pyrethroid pesticide factory workers. *Chemosphere*, 82:1080-1082.

Wang, H.P., Liang, Y.J., Sun, Y.J., Chen, J.X., Hou, W.Y., Long, D.X. *et al.* (2013). <sup>1</sup>H NMR-based metabolomic analysis of the serum and urine of rats following subchronic exposure to dichlorvos, deltamethrin, or a combination of these two pesticides. *Chemistry-Biology Interaction*, 203:588-596.

Wielgomas, B., Nahorski, W., Czarnowski, W. (2013). Urinary concentrations of pyrethroid metabolites in the convenience sample of an urban population of Northern Poland. *International journal of hygiene and environmental health*, 216:295-300.

Whitmore, R. W. , Zimmerman, F. W., Camann, D. E., Bond, A. E. , Lewis, R. G., Schaum J. L. (1994). Non-occupational exposures to pesticides for residents of two U.S. cities. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 26(1):47-59.

Woollen, B.H., Marsh, J.R., Laird W.J.D., Lesser J.E. (1992). The metabolism of cypermethrin in man: differences in urinary metabolite profiles following oral and dermal administration. *Xenobiotica*, 22(8):983-991.

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. *Environmental Pollution*, 158:1968–1973.

Zhang, S.Y., Ueyamab, J., Itoa, Y., Yanagibaa, Y., Okamura, A., Kamijimaa, M., *et al.* (2008). Permethrin may induce adult male mouse reproductive toxicity due to cis isomer nottrans isomer. *Toxicology*, 248:136–141.

Ziegler, R.G., Wilcox, H.B., Mason, T.J., Bill, J.S., Virgo, P.W. (1987). Seasonal variation in intake of carotenoids and vegetables and fruits among white men in New Jersey. *American Society for Clinical Nutrition*, 45:107-114.



# ANNEXE

---



Annexe 1:  $^1\text{H}$  NMR-based metabolomic analysis of biomarkers of effects in human urine samples following controlled and occupational exposure to pyrethroid pesticides.

---





# **<sup>1</sup>H NMR-based metabolomic analysis of biomarkers of effects in human urine samples following controlled and occupational exposure to pyrethroids pesticides**

## **Abstract**

Pyrethroid pesticides are a concern in the population and occupational health due to its wide use and effects on neurologic, immune and endocrine systems. Pathways leading to such effects are however poorly understood. To identify a possible spectrum of biomarkers of effects following pyrethroid exposure, an exploratory metabolomic analysis of human urine samples was conducted.

Six healthy volunteers and thirty agricultural workers exposed to cypermethrin provided a complete first morning urine void before and after exposure. Metabolomic analyses of urine samples were conducted by <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H NMR). Workers urinary metabolomic analysis indicated an increase in hippurate (p<0.0001), but lower excretion levels (p<0.05) of betaine, guanidoacetate, lysine, alanine and threonine. Actual acute exposure results suggest different metabolomic effects than occupational exposure and showed a decrease in amino acids excretion. Hippurate is an uremic toxin, which interferes with metabolic processes. A disruption in the kidney function is suspected and further work is required.

**Keywords:** Pyrethroid, Metabolomic analysis, <sup>1</sup>H NMR, cypermethrin, hippurate

## Introduction

Pyrethroids are insecticides widely used due to their low cost and efficiency. They are an occupational health concern as well as general population concern. They are also part of the products measured in the wide biomonitoring surveys in the general population in North America, in the Canadian Health Measures Survey (CHMS)<sup>1</sup> and the US National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES)<sup>2</sup>. Overall, more than 70% of US<sup>3</sup> population and 99% of Canada population<sup>1</sup> is suspected to be exposed to this class of pesticides. One of the most used pyrethroids is cypermethrin. Pyrethroids are compounds having an action on the nervous system due to a prolonged opening of sodium channels<sup>4,5,6</sup>. Some new studies also have shown immune toxic effects<sup>7,8,9</sup>, and endocrine disruptor effects<sup>10</sup>.

In the general population, ingestion through the diet is the main exposure route. However, in occupationally exposed workers, pyrethroids are absorbed mainly through the respiratory tract (as dust or aerosols) and dermal contact<sup>11</sup>. These substances are metabolized primarily in the liver by esterases and this is followed by oxidation<sup>5, 12</sup>. Metabolites are conjugated and excreted mainly in the urine within a few days<sup>5,13</sup>. Although knowledge of toxicological effects of pyrethroids is constantly improving, animal studies were shown not to be good models for studying the toxicokinetics<sup>4</sup> and limited human data on the mechanisms of pyrethroid toxicity are available<sup>8,10,14</sup>. As the diet leads to a chronic exposure and the toxicity mechanism pathways following low dose exposure is still unclear, chronic exposure is a concern for health.

There are limited human data on biomarkers of effects following pyrethroid exposure. These studies focus on changes in enzymes and hormones in the blood or urine, which mirror changes at a physiological level<sup>8,10,15</sup>. Endogenous metabolite changes express modifications in cellular regulation and metabolic processes. Metabolomic changes may express chronic exposure effects of a xenobiotic. Metabolomics identifies and quantifies the final components of the chain of biological metabolic reactions, gene transcripts of protein metabolic intermediates<sup>16,17,18</sup>. Studies have already been carried out on non-selective metabolic response

to pyrethroid exposure in animals<sup>19-26</sup>. In pregnant women, exposure to pesticides in general has been associated with changes in levels of glycine, threonine, lactate, citrate and urinary glycerophosphocholine<sup>14</sup>. However, it remains unclear whether changes in metabolomic profiles in humans may be caused by exposure to pyrethroids.

The use of <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy is increasingly used as a non-disruptive method for toxicity assessment and the characterization of new biomarkers<sup>27</sup> and it has been shown to be appropriate to observe metabolomic effects. It is now possible to link toxic effects of contaminants or diseases with specific metabolomic profiles<sup>27,28,29</sup>.

The aim of this study was thus to investigate metabolomic changes in accessible biological matrices following cypermethrin exposure in exposed volunteers or workers to provide insights into possible toxicity mechanism pathways. The objectives were i) to use a <sup>1</sup>H NMR-based metabolomic approach to investigate differences in the metabolic profile in urine of orally exposed volunteers and occupationally exposed workers, and ii) to identify new potential biomarkers of effect.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

Cypermethrin compounds used to prepare the exposure dose of volunteers were bought at EQ Laboratories (40 *cis*: 60 *trans* isomers; purity > 99%) (Atlanta, GA, USA). The internal standard 3-trimethylsilyl-2,2,3,3-d<sub>4</sub>-propionate (TMSP) for NMR analysis was purchased from Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Tewksbury, MA, USA).

### 2.2. Subjects

#### 2.2.1. Volunteers

Six healthy adult volunteers were selected: three men and three women. Participants were recruited on a voluntary basis among the students of the University of Montreal and their community. Volunteers were chosen to have *a priori* less variability in their profile. They were young Caucasian origin participants. They were aged between 24 and 37 years old. They were healthy, non-smokers and did not take medication or alcohol. They had never been exposed in the three months prior to pyrethroid dosing, except perhaps through their diet. During the study period and the two-days prior to dosing, they were asked not to eat fruits and vegetables in order to limit ingestion of contaminated food, since we know that diet is usually the main absorption pathway. They were also requested to avoid consumption of alcohol and drugs during this period, since it is known to affect the metabolism of some chemical compounds.

#### 2.2.2. Workers

Agricultural farms from southern Quebec, Canada, were selected using the following criterias: more than 10 workers, in Monteregie aera, using pyrethroid pesticides and interested in participating in the study. In total, 34 workers were recruited from three farms located in the Province of Quebec and dedicated to the production of vegetables. For technical reasons, only 30 worker samples were analyzed for metabolomic changes.

### 2.2.3. Ethics

The experimental protocol and consent forms were approved by the Research Ethics Committee of the Faculty of Medicine of the University of Montreal. All the participants gave their written consent and were informed of the risks of participating and their right to withdraw from the study at any time. Participants received a monetary compensation for their time and any inconvenience caused.

## 2.3. Exposure

### 2.3.1. Volunteer exposure

The experimental dosing and sampling was conducted at the Department of Environmental and Occupational Health of the University of Montreal, Canada. The morning of study onset, healthy subjects ingested an acute oral dose of cypermethrin equivalent to  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  body weight (bw) dissolved in biological olive oil, a dose below the acute reference dose (RfD) established by the U.S. EPA to prevent adverse effects<sup>30</sup>. They were provided organic prepared meals. All study design details were published in Ratelle *et al.* (2014)<sup>31</sup>.

### 2.3.2. Worker exposure

Workers were exposed in occupational conditions to a pesticide formulation (Ripcord<sup>®</sup>) containing cypermethrin as the main active ingredient. There were no specific inclusion criteria with regard to smoking status, age, gender, socio-economic status or health status. Workers were all assessed under their normal exposure conditions. All study design details were published in Ratelle *et al.* (2014)<sup>32</sup>.

## 2.4. Sample collection

### 2.4.1. Collection of urine in volunteers

Urine samples of volunteers were collected in Nalgene<sup>®</sup> 1L bottle. A pre-exposure urine sample was collected and corresponded to the first morning urine the day of dosing, as

collected between 5 a.m. and 8 a.m. After ingestion of a dose of  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  bw of cypermethrin at 8 a.m., a second urine of each volunteer was collected from midnight until 8 a.m. on the next day. Samples were aliquoted and kept at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis.

#### 2.4.2. Collection of urine for workers

Urine samples of workers were collected in individual Nalgene<sup>®</sup> 1L bottle. A pre-exposure urine was collected as the first Monday morning urine void following two days without occupational exposure. The morning following onset of an exposure episode, another urine sample was collected as a post-exposure sample. Samples were aliquoted and kept at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis.

#### 2.4.3. Questionnaire

During the study period, subjects were asked to fill a self-administered questionnaire to document personal information (sex, age, ethnic origin, highest educational level, general health status) along with information on life-habits (physical activities, domestic and professional use of pesticide containing products from a pre-established list, smoking habits or exposure to secondary smoke, alcohol consumption, medication, intake of food that may contain pesticide residues like consumption of fruits, vegetables and cereals). All those factors are known to have influence on absorbed dose and metabolism of xenobiotics. They had also to report possible dosing-related symptoms.

### 2.5. $^1\text{H}$ NMR spectroscopic method

A volume of  $400 \mu\text{l}$  of urine was mixed with  $200 \mu\text{l}$  of buffer solution containing TMSP (0.5 M), as an internal standard for chemical shift reference. Samples were centrifuged at  $12000 \text{ g}$  for 5 min to remove any precipitates. Supernatant ( $550 \mu\text{l}$ ) was transferred in NMR tubes for analysis. The preparation procedure is described in Beckonert *et al.*, (2007)<sup>33</sup>.  $^1\text{H}$  NMR spectra of these samples were acquired on a Bruker-Advance 500 spectrometer (Germany) at 300 K, located in High-Field Nuclear Magnetic Resonance Center in Academia Sinica, Taiwan. Spectra were acquired using a pulse sequence nuclear overhauser enhancement spectroscopy

(NOESY). The water signal in urine was suppressed ( $d_1-90^\circ-t_1-90^\circ-t_m-90^\circ$ ). Spectrum were collected into 32k data points with a width of 10000 Hz (20 ppm) and 128 scans, with a relaxation delay of 2 s and an acquisition time of 1.63 s. The exponential function was 0.3 Hz, which was multiplied by the free induction decays (FIDs) before Fourier transformation. The  $O_1$  and the  $P_1$  parameters were optimized for each sample to enhance spectral quality. The raw spectrum was phased, baseline corrected, and calibrated by TMS ( $\delta$  0.0 ppm) with the Topspin<sup>®</sup> software (Bruker, Germany).

The spectrum was then imported into custom-written *ProMetab* software (Viant, 2003)<sup>34</sup> in Matlab<sup>®</sup> (MathWorks, USA). The spectrum was then segmented to a 0.005 ppm width. The residual water and urea signal region was excluded of the processing ( $\delta$ 4.3 ppm- $\delta$ 6.3 ppm). All remaining regions of the spectra were then normalized to the total integrated area of the spectra to reduce any significant urinary differences. The NMR data were being subjected to an orthogonal projections to latent structure modeling (OPLS-DA) using the SIMCA 13<sup>®</sup> software package (Umetrics AB, Umea, Sweden). Score plots were used to visualize the separation between the control and treatment groups. The loading plots demonstrated the <sup>1</sup>H NMR spectral regions that contributed the most to the separation of samples in the score plots. Each peak corresponds to a particular metabolite, identified with Chenomx<sup>®</sup> software (Edmonton, Alberta, Canada). This software contains a database of over 600 spectra of the most biologically relevant compounds. Selected metabolites were then statistically processed to confirm the statistical significance.

## 2.6. Statistical analysis

IBM SPSS<sup>®</sup> software (Armonk, New York, US, version 17) was used for statistical analysis. Each peak was analyzed with nonparametric tests after testing the normality of non-transformed data and log-transformed data. Wilcoxon test was used to determine the significant increase or decrease in assigned metabolites in treated samples relative to the controls ( $p < 0.05$ ). Then, a nonparametric Mann-Whitney test was done to test the influence

of gender, age, body mass index, ethnicity, alcohol consumption, smoking and high urinary levels of glucose.



## 3. Results

### 3.1. $^1\text{H}$ NMR spectroscopy analysis of urine of volunteers

Fig.1 shows a representative  $^1\text{H}$  NMR spectrum with identified metabolites from volunteer urine. Those peaks verification can be found in a wide range of metabolomic studies<sup>14</sup>. After OPLS-DA, score plots reveal no differences in metabolite levels between urine samples collected between before and after exposure ( $Q^2 < 0$ ). Well-resolved and identified metabolites were further analyzed using Wilcoxon test in volunteer samples. The pesticide-induced changes in endogenous metabolite levels in urine are summarized in Table 1. Although sample size was limited ( $n=6$ ), urinary metabolomic analysis indicates that pyrethroid exposure caused a significant decrease in acetate, creatinine and taurine ( $p < 0.05$ ).

### 3.2. $^1\text{H}$ NMR spectroscopy analysis of urine in workers samples

Fig.2.A. shows the results of OPLS-DA analysis with two components of urine spectrometry from workers prior and following an exposure episode. The x-axis is the first component demonstrating inter-group variation, while y-axis is the orthogonal component showing intra-group variation. Score plots reveal that urine sample groups are distinct between pre- and post-exposure, suggesting that pyrethroid exposure affects the urinary metabolite profiles. The OPLS-DA model with two components offers an acceptable  $Q^2$  value of 0.235. For biological data, this range is generally admitted to represent a fair classification model<sup>35</sup>. That loading plot demonstrated which metabolites contributed the most to the separation of samples in the score plots (Fig.2.B). A total of 4 workers with high levels of glucose were excluded from the plot because glucose contribution placed those one in a third cluster. Since glucose levels were similar before and after exposure, that cannot be justified by the pyrethroid exposure. The 20 highest peaks identified from the loading plot in workers spectra were selected to examine pesticide effects using Wilcoxon test. From those, thymol was found in low concentrations in the majority of samples, but it was not considered for analysis because we used it in the

collection bottles to prevent bacterial growth. Ethanol presence was also found in four samples and was not considered for statistical analysis.

The pesticide-induced changes in metabolite levels in urine are summarized in Table 1. Urinary metabolomic analysis indicates that pyrethroid exposure caused a significant increase in hippurate, and a decrease in alanine, betaine, guanidoacetate, lysine and threonine.

We also compared urinary metabolite profiles according to age ( $\leq 40 / > 40$  years old), body mass index ( $\leq 25 / > 25$ ), gender (male/female), ethnicity (Latino/Caucasian), smoking (yes/no), high glucose level (yes/no), alcohol consumption during the study (yes/no). Significance of those variables are found in Table 2. Significant changes in metabolomics ( $p < 0.05$ ) were observed according to gender, glucose concentration, alcohol consumption and smoking habits.

## 4. Discussion

In the current study, a metabolomic approach was used to investigate differences in the urinary metabolic profile of orally exposed volunteers and workers occupationally exposed to cypermethrin to identify potential new biomarkers of effect that could lead to a better understanding of toxicity following acute or chronic exposure. Cypermethrin is a pyrethroid pesticide found in daily diet of almost everyone. Worker exposure was already found to be higher than the general population exposure<sup>32</sup>. It was previously demonstrated by exogenous metabolite quantification, like 3-PBA metabolite, is considered a biomarker of exposure. However, urinary metabolites may also be used as a biomarker of effect: endogenous metabolites can inform on toxicological effects of contaminants. Urine is the end product of an elimination metabolic process including glomerular filtration, reabsorption and excretion from tubules. Therefore, the composition and concentration of urinary metabolites are affected by this elimination system.

The observed lower levels of urinary amino acids and their derivatives post-exposure as compared to pre-exposure could indicate that renal tubules were damaged, but usually this type of damage results in decreased reabsorption and hence in increased amino acid excretion in urine<sup>36</sup>. Decrease in urinary amino acids levels can also come from the modification of transporter synthesis or availability in the intestine or kidney cells<sup>37</sup>. Some transporters like taurine active transport TauT is a sodium-dependent transporter<sup>38</sup>. Shifts in amino acid production could also indicate changes in protein synthesis, necessary for repair of damages caused by exposure<sup>39</sup>. At this time, current results do not inform about the amino acids modification mechanisms. In fact, with the current data, it is difficult to identify the exact process responsible for the difference in urinary concentrations between samples collected before and after exposure. It may have occurred during the absorption, distribution and metabolism or elimination step (Fig.3), and several factors can influence these concentrations. Amino acids (lysine, alanine, threonine), their derivatives (guanidoacetate, taurine, betaine, creatinine) and other molecules coming from xenobiotic compounds (hippurate) will then be found in different concentrations.

For workers, significant urinary metabolite changes according to gender, high glucose, alcohol consumption and smoking habits have already been mentioned in other studies. Indeed, in the presence of alcohol, decreased elimination of hippuric acid was observed<sup>40</sup> and differences in the urinary excretion according to gender were also observed<sup>41</sup>. Threonine is a precursor of pyruvate, involved in the regulation of gluconeogenesis<sup>42</sup>. It is not surprising to find a difference according to high levels of glucose.

Differences in urinary concentrations of endogenous molecules were observed between acutely exposed volunteers and workers, the latter being more representative of general population exposure. These differences may be explained simply by variations in metabolism following high as compared to low exposure doses. It has been observed that for some external stresses, metabolomic changes in an animal body differed between chronic and acute exposure groups, as for the excretion of hippurate<sup>43</sup>.

Hippurate is produced in presence of benzoic acid coming from exogenous or endogenous precursors and glycine<sup>44</sup>. 3-phenoxy benzoic acid (3-PBA), the main pyrethroid exogenous metabolite, is eliminated in urine following conjugation<sup>45</sup>. Glycine is its most common urinary conjugate, but this exogenous metabolite may also be conjugated with taurine and glucuronic acid<sup>45</sup>. Moreover, glycine showed a decrease but not significant and taurine also presented a statistically significant decrease in workers. This seems to be an adaptive response to the concentration of exogenous metabolites but may also be precursor of effects.

Moreover, 3-PBA, is a possible substrate to hippurate. Hippurate is eliminated from the plasma through the kidney by active tubular secretion<sup>44</sup>. Hippurate belongs to the group of uremic toxins, which interfere with normal physiological and metabolic processes; it is involved in the correction of metabolic acidosis, developing into one of the key consequences of kidney function reduction and acceleration of kidney disease progression<sup>46</sup>.

Other observed metabolite modifications could be precursors of toxic response. Betaine is identified to increase glutathione production, responsible for detoxification in the liver. The decrease in betaine synthesis could decrease hepatic detoxification. Taurine and alanine are

neurotransmitters and alanine contributes also to lymphocytes production. The immune and neurologic systems are already known to be affected by pyrethroid exposure.

As in this work, other studies have already showed that an exposure to a complex mixture of pesticides in humans could change glycine, threonine and citrate levels with the first two in an upward trend and citrate in a downward trend<sup>14</sup>. However, this last study was performed in pregnant women, which could lead to results different from those that would be observed in healthy male workers. Deltamethrin dosing in rats showed no change in hippurate at any dose but an increase or decrease in other analyzed molecules depending on the dose and the presence of other pesticides<sup>20</sup>.

The significant differences in creatinine levels between pre- and post-dosing samples in volunteers may question the adjustment of metabolite excretion to creatinine contents in urine. The excretion of creatinine is an indicator of kidney filtration rate, called glomerular filtration. Creatinine, eliminated only by the kidney, is not reabsorbed. Creatinine is an indicator of renal function. The adjustment of other endogenous metabolites concentrations for creatinine contents changed the significance of results. The creatinine-adjustment results still showed a significant modification in betaine excretion between pre- and post-exposure samples, but also led to a decrease in 4-hydroxyphenylacetate, dimethylamine, guanidoacetate, hippurate and trigonelline, not observed prior to adjustment. The effect on creatinine levels may also be explained by the large amounts of blood withdrawn in volunteers which may have caused a decrease in blood volume and hence a decrease in blood flow to the kidney, reducing the urinary creatinine excretion. No significant changes in creatinine levels between pre- and post-exposure samples were noted for workers.

Using nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H NMR) spectroscopy has been proven to be an effective, non-destructive and fast method to quantify metabolites in a sample. The OPLS-DA model is a good model for biological system<sup>35</sup>. The clusters obtained by OPLS-DA model illustrate the variance in samples. This general variance could not be related to experimental factors<sup>39</sup>. Also, some factors like sex, diurnal variations and age may cause metabolomics changes<sup>47</sup>. It is difficult to overcome this uncertainty in environmental conditions in a human model, but

urines were collected at the same time of day, and food was also controlled for the clinical study in volunteers, reducing external variation.

Volunteers study included only six subjects, which is a small sample. Workers study and occupational conditions are difficult to restrict only to cypermethrin exposure. Even if the farm owners certified that no pyrethroid pesticide application was done in the last two weeks before the study period, they admitted that other types of environmental contaminants were used in their fields like fertilizers but we were not able to get a complete register of those products or applications. For the occupational exposure, the association between metabolomic changes and pyrethroid exposure is limited. Overall, obtaining human data is the first step toward a better knowledge of occupational pyrethroid exposure.

Current results show that pyrethroid exposure resulted in modifications in endogenous and exogenous metabolite excretion. Endogenous metabolite changes could be considered as biomarkers of effects and that is a first step for an exploratory risk assessment.

## Conclusion

This study allowed a better understanding of endogenous metabolite changes following exposure to pyrethroids. Our results indicate that pyrethroids can induce nephrotoxicity and hepatotoxicity. The NMR-based metabolomic analysis provided new data to evaluate pesticide toxicity, which can complement toxicological studies. Several biomarkers are needed to define a pattern to better understand the relevance of the network<sup>17</sup>. The current results are exploratory results and can be viewed as the first step to a more complete study.

## **Conflict-of-interest notification**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## **Acknowledgements**

This work was supported mainly by grants from the Institute de recherche Robert Sauvé en santé et sécurité du travail (IRSST) and had also received a support from Institute of research in public health of University of Montreal (IRSPUM). The student received a grant from Institute of research of Canada Institute of health research (CIHR) and support from National Science Council (NSC) to establish collaboration with National Taiwan University. The NMR spectra analyses were done at the Core Facility for Protein Structural Analysis supported by National Core facility Program for Biotechnology.



## References

1. Health Canada. Second Report on Human Biomonitoring of Environmental Chemicals in Canada-Evidence from the Canadian Survey of Health Measures Cycle 2 (2009-2011). Government of Canada, 2013, 446 p.
2. CDC. Third national report on human exposure to environmental chemicals. Atlanta (GA), Center for Disease Control and Prevention, 2005.
3. Barr DB, Olsson, AO, Wong LY, Udunka S, Baker SE, Whitehead JRD, *et al.* Urinary concentrations of metabolites of pyrethroids insecticides in the general US population: national health and nutrition examination survey 1999-2002. *Environ health perspect* 2010; 118 (6): 742-8.
4. Scollon EJ, Starr JM, Godin SJ, DeVito MJ, Hughes MF. In vitro metabolism of pyrethroid pesticides by rat and human hepatic microsomes and cytochrome p450 isoforms. *Drug Metab Dispo* 2009; 37: 221-8.
5. Kühn, KH, Wieseler B, Leng G, Idel H. Toxicokinetics of pyrethroid in humans: consequences for biological monitoring. *Bull Environ Contam Toxicol* 1999; 62: 101-8.
6. Tomalik-Scharte D, Lazar A, Meins J, Bastian B, Ihrig M, Wachall B, *et al.* Dermal absorption of permethrin following topical administration. *Eur J Clin Pharmacol* 2005; 61: 399-04.
7. Dilek F, Muranli G. Genotoxic and cytotoxic evaluation of pyrethroid insecticides  $\lambda$  - cyhalothrin and  $\alpha$  -cypermethrin on human blood lymphocyte culture. *Bull Environ Contam Toxicol* 2013; 90: 357-63.
8. Emara AM, Draz EI. Immunotoxicological study of one of the most common over-the-counter pyrethroid insecticide products in Egypt. *Inhal Toxicol* 2007;19: 997-009.
9. Hadnagy W, Leng G, Sugiri D, Ranft U, Idel H. Pyrethroids used indoors--immune status of humans exposed to pyrethroids following a pest control operation--a one year follow-up study. *Int J Hyg Envir Heal* 2003; 206: 93-02.
10. Meeker JD, Barr DB, Hausser R. Pyrethroid insecticide metabolites are associated with serum hormone levels in adult men. *Reprod Toxicol* 2009; 27: 155-60.

11. INRS. Pyrethriñoïdes de synthèse halogénés, 2010 [cited 2011 feb 22] Available from :[http://www.inrs.fr/INRS-PUB/inrs01.nsf/IntranetObjectacesParReference/BIO\\_SD\\_389/\\$File/Visu.html](http://www.inrs.fr/INRS-PUB/inrs01.nsf/IntranetObjectacesParReference/BIO_SD_389/$File/Visu.html)
12. Choi J, Rose RL, Hodgson E. In vitro human metabolism of permethrin: the role of human alcohol and aldehyde dehydrogenases. *Pestic Biochem Phys* 2002; 73:117-28.
13. Woollen BH, Marsh JR, Laird WJD, Lesser JE. The metabolism of Cypermethrin in man: differences in urinary metabolite profiles following oral and dermal administration. *Xenobiotica* 1992; 22: 983-91.
14. Bonvallot N, Tremblay-Franco M, Chevrier C, Canlet C, Warembourg C, Cravedi JP *et al.* Metabolomics tools for describing complex pesticide exposure in pregnant women in Brittany (France). *Metabolomics and multiple pesticides exposure* 2013; 8(5): 1-9.
15. Meeker, J.D., Barr, D.B., Hausser, R. (2008). Human semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary metabolites of pyrethroids insecticides. *Human reproduction*, 23 (8):1932-1940.
16. Krug, S., Kastenmuller, G., Stuckler, F., Rist, M.J., Skurk, T., Sailer, M., Raffler, J., Romish-Margl, W., Adamski, J., Prehn, C., Frank, T., Engel, K.H., Hofmann, T., luy, B., Zimmermann, R., Moritz, F., Schmitt-Kopplin, P., Krumsiek, J., Kremer, W., Huber, F., Oeh , U., Theis, F.J., Szymczak, W., Hauner, H., Suhre, K., Daniel, H. (2012). The dynamic range of the human metabolome revealed by challenges. *The FASEB journal*, 26:2607-2619.
17. Dumas ME. Metabolome 2.0: quantitative genetics and network biology of metabolic phenotypes. *Mol.BioSyst* 2012; 8:2494-502.
18. Fiehn, O., Kopka, J., Dörmann, P., Altmann, T., Trethewey, R.N., Willmitzer, L. (2000). Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nature Biotechnology*, 11:1157-1161.
19. Carriquiriborde, P., Marino, D.J., Giachero, G., Castro, E.A., Ronco, A.E. (2012). Global metabolic response in the bile of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*, Pisces) sublethally exposed to the pyrethroids cypermethrin. *Ecotoxicology and environmental safety*, 76:46-54.
20. Wang HP, Liang YJ, Sun YJ, Chen JX, Hou WY, Long DX *et al.* 1H NMR-based metabolomic analysis of the serum and urine of rats following subchronic exposure to

- dichlorvos, deltamethrin, or a combination of these two pesticides. *Chem-Biol Interact* 2013; 203:588-96.
21. Hernández-Moreno D, Soler F, Míguez MP, Pérez-López M. Brain acetylcholinesterase, malondialdehyde and reduced glutathione as biomarkers of continuous exposure of tench, *Tinca tinca*, to carbofuran or deltamethrin. *Sci. Total Environ* 2010; 408: 4976–83.
  22. Issam C, Samir H, Zohra H, Monia Z, Hassen V. Toxic responses to deltamethrin low doses on gonads, sex hormones and lipoperoxidation in male rats following subcutaneous treatments. *J Toxicol Sci* 2009; 34 : 663–70.
  23. Johri A, Yadav S, Singh RL, Dhawan A, Ali M, Pamar D. Long lasting effects of prenatal exposure to deltamethrin on cerebral and hepatic cytochrome P450s and behavioral activity in rat offspring. *Eur J Pharmacol* 2006; 544: 58–68.
  24. Tuzmen MN, Candan N, Kaya E. The evaluation of altered antioxidative defense mechanism and acetylcholinesterase activity in rat brain exposed to chlorpyrifos, deltamethrin, and their combination. *Toxicol Mech Methods* 2007; 17: 535–40.
  25. Tuzmen N, Candan N, Kaya E, Demiryas N. Biochemical effects of chlorpyrifos and deltamethrin on altered antioxidative defense mechanisms and lipid peroxidation in rat liver. *Cell Biochem Funct* 2008; 26: 119–124.
  26. Yousef MI, Awad TI, Mohamed EH. Deltamethrin-induced oxidative damage and biochemical alterations in rat and its attenuation by Vitamin E. *Toxicology* 2006; 227: 240–7.
  27. Lin CY, Viant M, Tjeerdema R.S. Metabolomics: methodologies and applications in the environmental sciences. *J Pestic Sci* 2006; 31(3):245-51.
  28. Beger, R.D., Sun, J., Schnackenberg, L.K. (2010). Metabolomics approaches for discovering biomarkers of drug-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity. *Toxicology and applied pharmacology*, 243:154-166.
  29. Liu, J., Litt, L., Segal, M.R., Kelly, M.J.S., Pelton, J.G., Kim, M. (2011). Metabolomics of oxidative stress in recent studies of endogenous and exogenously administered intermediate metabolites. *International journal of molecular sciences*, 12:6469-6501.

30. U.S. EPA. Reregistration eligibility decision (RED) for cypermethrin. U.S. Environmental Protection Agency, Prevention, Pesticides and Toxic Substances, 2008, EPA OPP-2005-0293
31. Ratelle, M., Coté, J., Bouchard, M.. Systematic comparison of toxicokinetic parameters of cypermethrin and permethrin biomarkers of exposure in orally exposed volunteers. *Toxicol. Lett.* Submitted on September 2014.
32. Ratelle, M., Coté, J., Bouchard, M. Within and between-subject variability assessed from time courses of pyrethroid biomarkers of exposure in a group of agricultural workers in Quebec, Canada. *International Journal of Hygiene and Environmental Health.* Submitted on September 2014.
33. Beckonert O, Keun HC, Ebbels TMD, Bundy J, Holmes E, Lindon JC *et al.* Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts, *Nat Protoc* 2007; 2: 2692–703.
34. Viant MR. Improved methods for the acquisition and interpretation of NMR metabolomic data. *Biochem Biophys Res Comm* 2003; 310:943-8.
35. Sadeghi-Bazargani H, Banani A, Mohammadi S. Using SIMCA statistical software package to apply orthogonal projections to latent structures modeling. *World automation congress*, 2010; 1: 1-6.
36. Macpherson NA, Moscarello MA, Goldberg DM. Aminoaciduria is an earlier index of renal tubular damage than conventional renal disease markers in the gentamicin-rat model of acute renal failure. *Clin Invest Med.* 1991; 14(2):101-10.
37. Broer S. Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiol Rev*, 2008; 88:249-86.
38. Chesney RW, Patters AB, Han X. Taurine and kidney. In: *Taurine and health and disease*, El Idrissi A and L'Amoureux W Editors, 2012; p.75-99.
39. Lin C., Anderson BS, Phillips BM, Peng AC, Clark S, Voorhees J *et al.* Characterization of the metabolic actions of crude versus dispersed oil in salmon smolts via NMR-based metabolomics. *Aquatic Toxicology* 2009; 95: 230-8.

40. Inoue O, Seiji K, Watanabe T, Nakatsuka H, Jin C, Liu SJ, Ikeda M. Effects of smoking and drinking on excretion of hippuric acid among toluene-exposed workers. *Int Arch Occup Environ Health*. 1993;64(6):425-30.
41. Slupsky, C.M., Rankin, K.N., Wagner, J., Fu, H., Chang, D., Weljie, A.M., Saude, E.J., Lix, B., Adamko, D.J., Shah, S., Greiner, R., Sykes, B.D., Marrie, T.J. Investigations of the Effects of Gender, Diurnal Variation, and Age in Human Urinary Metabolomic Profiles. *Anal. Chem*. 2007 (79): 6995-7004.
42. Scrutton, M.C., Utter, M.H. The regulation of glycolysis and gluconeogenesis in animal tissues. *Annu. Rev. Biochem*. 1968 (37):249-302
43. Wang, X., Zhao, T., Qiu, Y., Su, M., Jiang, T., Zhou, M., Zhao, A., Jia, W. Metabonomics Approach to Understanding Acute and Chronic Stress in Rat Models. *J. Proteome Res.*, 2009; 8 (5): 2511–8.
44. Dzurik R, Spustova V, Krivosikova Z, Gazdikova K. Hippurate participates in the correction of metabolic acidosis. *Kidney Int*. 2001; 59, suppl 78: S-278-81.
45. Kaneko, H. Pyrethroid chemistry and metabolism, in: Kriedger, R. (Eds), Hayes' Handbook of pesticide toxicology. Academic Press, 2010: 1635-1663.
46. Deguchi T, Takemoto M, Uehara N, Lindup WE, Suenaga A, Otagiri M. Renal clearance of endogenous hippurate correlates with expression levels of organic anion transporters in uremic rats. *The J. Pharmacol. Exp. Ther*. 2005; 314(2): 932-8.
47. Plumb RS, Granger JH, Stumpf CL, Johnson KA, Smith BW, Gaulitz S *et al*. A rapid screening approach to metabonomics using UPLC and TOF mass spectrometry: application to age, gender and diurnal variation in normal/Zucker obese rats and black, white and nude mice. *Analyst* 2005; 130: 844-9.

## Captions to figures

**Figure 1.** A representative  $^1\text{H}$  NMR spectrum with identified metabolites in urinary volunteer sample.

**Figure 2.** OPLS-DA score plots from the analysis of  $^1\text{H}$  NMR spectra of urine in the pre- and post- exposure samples of workers ( $n=26$ ) (A) and corresponding loading plot (B). Yellow triangles represent pre-exposure samples and green pentagons represent post-exposure samples.

**Figure 3.** Scheme representing the steps (yellow) that may explain differences in concentrations of metabolites in the urine before and after exposure to insecticides and associated endogenous metabolite molecules.

**Table 1. Endogenous metabolite assignments and relative change in urinary concentrations of metabolites in volunteers and workers before and after exposure to pyrethroids.**

	Metabolite assignments	Chemical shift (multiplicity) <sup>†</sup>	Volunteers (n=6)		Workers (n=30)	
			Relative changes (%) <sup>H</sup>	Test value (p value)	Relative changes (%) <sup>H</sup>	Test value (p value) <sup>#</sup>
1	Threonine	1.3 (d) <sup>^</sup> , 3.6 (d), 4.3 (m)	-20	0.091	-11	0.006**
2	Lysine	1.4 (m), 1.7 (m) <sup>^</sup> , 1.9 (m), 3.0 (t), 3.7 (t)	-12	0.398	-8.9	0.003**
3	Alanine	1.5 (d), 3.8 (dd) <sup>^</sup>	-31	0.063	-15	0.007**
4	Acetate	1.9 (s) <sup>^</sup>	-23	0.028*	23	0.120
5	Citrate	2.5 (d) <sup>^</sup> , 2.7 (d)	0	0.612	0.8	0.910
6	Dimethylamine	2.7 (s) <sup>^</sup>	4	0.612	-4	0.517
7	Trimethylamine	2.9 (s) <sup>^</sup>	-14	0.499	-6	0.125
8	Creatinine	3.0 (s) <sup>^</sup> , 4.0 (s)	-7	0.018*	-1	0.586
9	Trimethylamine N-oxide	3.3 (s) <sup>^</sup>	-8.4	0.176	-0.8	0.299
10	Taurine	3.4 (t) <sup>^</sup>	-7	0.018*	0.2	0.975

11	Betaine	3.3 (s), 3.9 (s)^	37	0.063	-7	0.019*
12	4-hydroxy-phenylacetate	3.4 (s), 6.8 (d), 7.2 (d)^	-4	0.866	-10	0.600
13	Glycine	3.6 (s)^	-9	0.310	-6	0.106
14	Threonate	3.6 (q), 3.7 (dd), 4.0 (m), 4.0 (d)^	-10	0.091	-7	0.252
15	Guanidoacetate	3.8 (s)^	15	0.176	-12	0.004**
16	Creatinine phosphate	3.0 (s), 3.9 (s)^	-4	0.310	2	0.861
17	Hippurate	4.0 (d), 7.5 (t), 7.6 (t), 7.8 (d)^, 8.5 (s)	15	0.398	60	<0.001**
18	Trigonelline	4.4 (s), 8.1 (t)^, 8.8 (d), 8.8 (d), 9.1 (s)	29	0.310	-7	0.441

---

^ Metabolites selected for semi-quantifications

f s singlet, d doublet, t triplet, q quartet, dd double doublet, m multiplet

H Relative change is described by the equation: (mean of treatment- mean of control / mean of control) x 100%

# p value by Wilcoxon nonparametric test

\* Significant at p<0.05

\*\* Significant at p<0.01



**Table 2. . Comparison of urinary metabolite excretion in workers according to gender, age, body mass index, high glucose level, alcohol consumption during study, smoking and ethnicity.**

Variables	Binary variable	Sample (n=30)	Significant metabolites *
Gender	Female	4	Betaine , Citrate, Guanidoacetate, Taurine
	Male	26	
	Missing value	0	
Age	≤ 40 years old	21	
	> 40 years old	6	
	Missing value	3	
Body Mass Index	≤ 25	13	
	> 25	15	
	Missing value	2	
High level of glucose	Yes	4	Threonate, Threonine
	No	26	
	Missing value	0	
Alcohol consumption	Yes	4	Hippurate, Trimethyl-N-oxide
	No	26	
	Missing value	0	
Smoking	Yes	4	Creatinine
	No	26	
	Missing value	0	
Ethnicity	Latino	23	
	Caucasian	7	
	Missing value	0	

\* Statistical differences with nonparametric Mann-Whitney test at  $p < 0.05$ .

Fig.1.

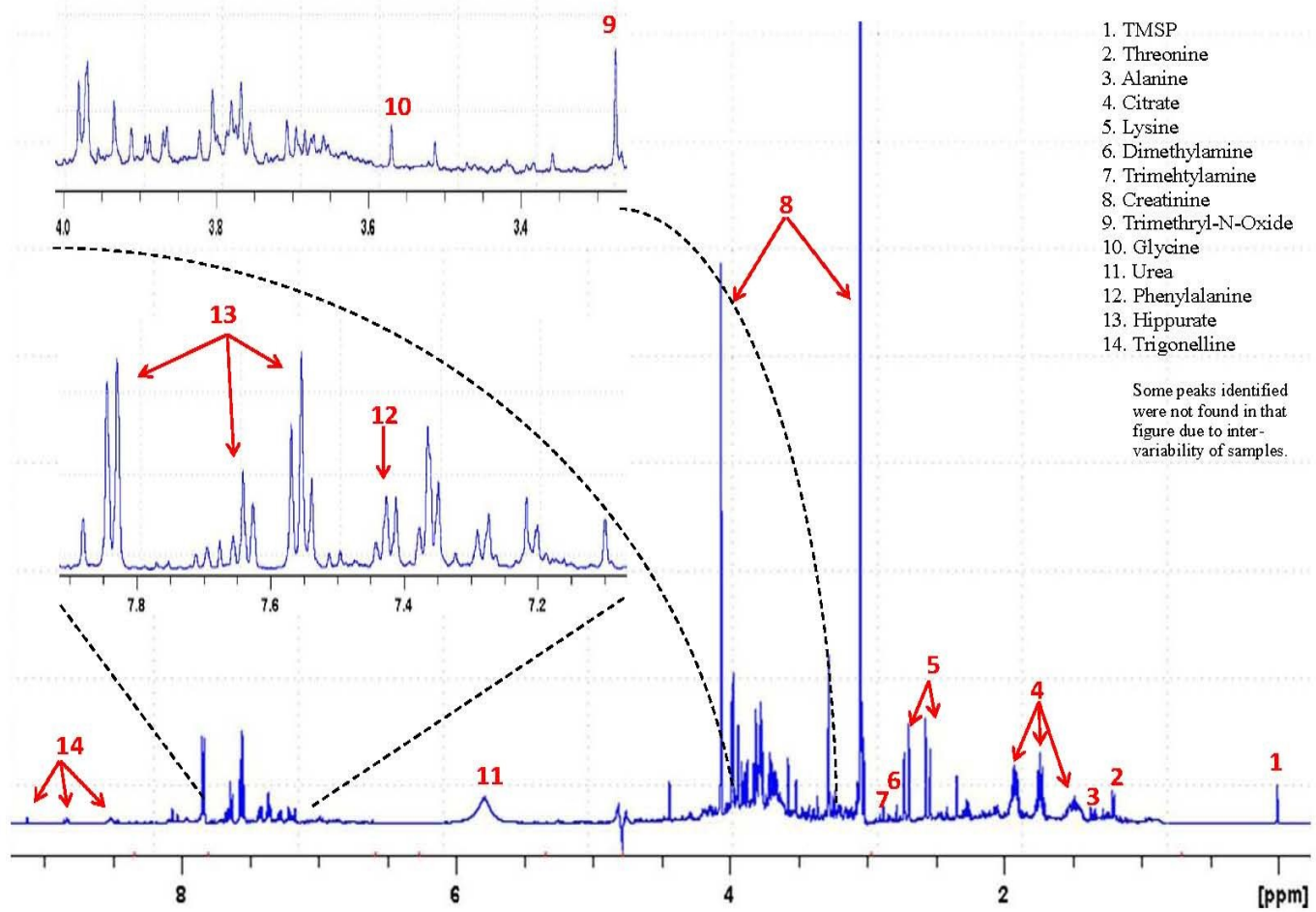
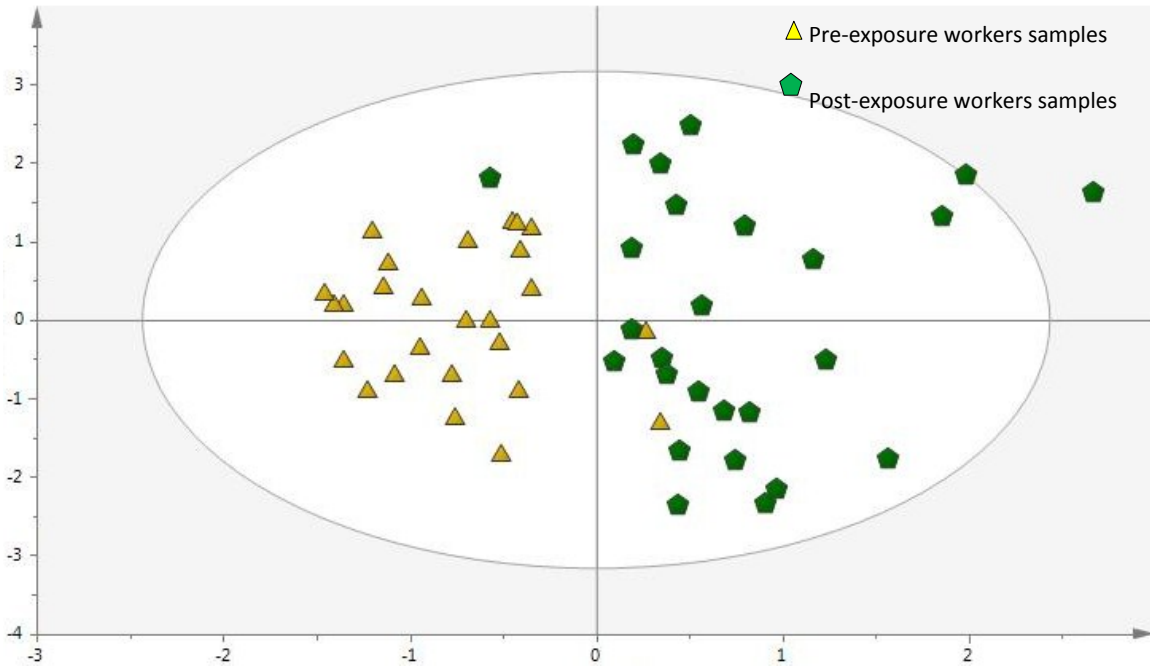


Fig. 2.

A)



B)

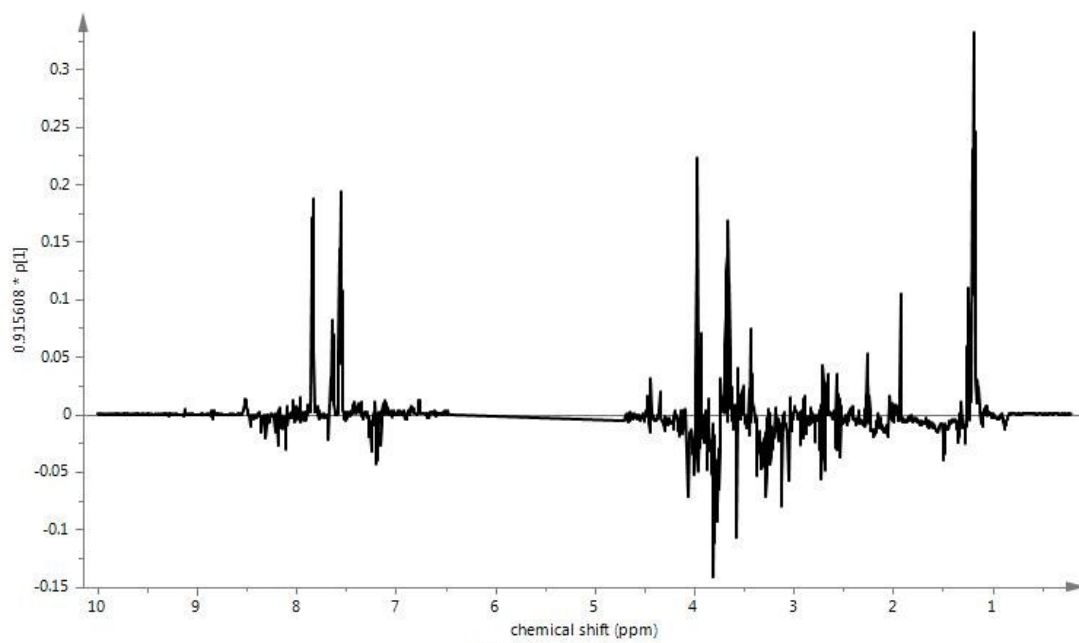
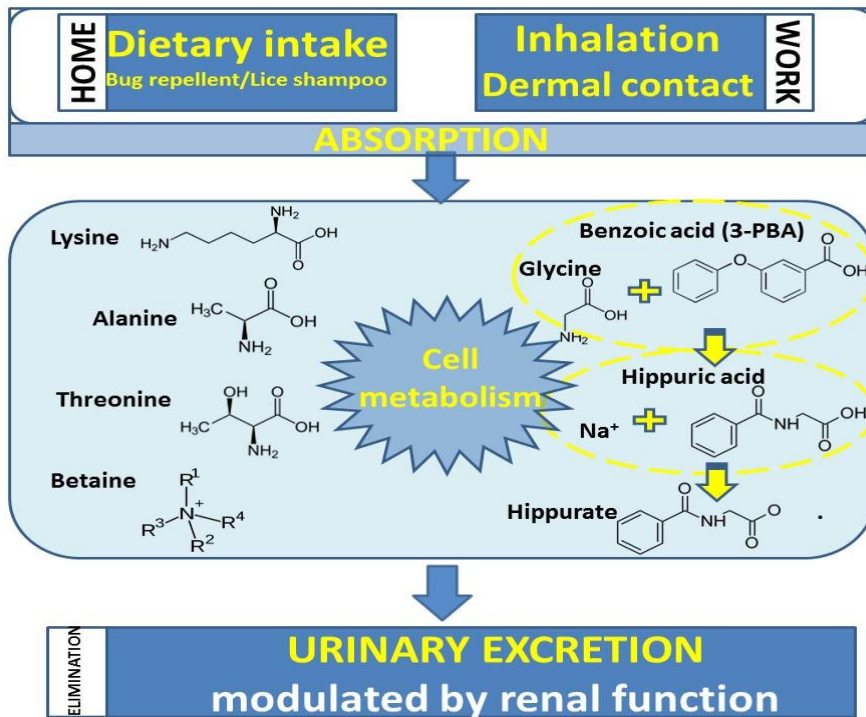


Fig. 3





© Mylène Ratelle, 2015