

EvExPe : Evaluation de l'Exposition chronique aux Pesticides : performances et optimisation des dosages sur urine et sur cheveux

Brice M.R. Appenzeller

Mail : brice.appenzeller@lih.lu

Responsables des équipes impliquées

- Appenzeller Brice M.R., Human Biomonitoring Research Unit, Luxembourg Institute of Health
- Zaros Cécile, INED, Paris

Mots clefs

Biomonitoring, pesticides, exposition, matrices biologiques

Le projet EvExPe visait à améliorer les outils de diagnostic de l'exposition aux pesticides que sont les dosages sur urines et cheveux, afin de permettre une utilisation optimale de ces biomarqueurs, notamment dans le cadre d'études épidémiologiques focalisées sur les effets sur la santé de ces expositions. Le développement de nouvelles méthodes analytiques multi-résidus particulièrement sensibles a permis l'étude comparative des deux matrices et l'évaluation de l'apport respectif des urines et des cheveux quant à l'évaluation de l'exposition aux pesticides. La mise en évidence, sur un modèle animal, de la relation de proportionnalité entre la concentration en pesticides dans les poils des animaux et le niveau d'exposition a permis de démontrer l'intérêt de cette matrice dans un contexte de biomonitoring. Enfin, l'application des méthodes développées à l'analyse de prélèvements biologiques humains a permis pour la première fois de documenter d'une manière objective l'exposition des individus par deux matrices parallèles, en soulignant également le caractère multiple de l'exposition.

Contexte et objectifs

Les expositions professionnelles et environnementales aux résidus pesticides sont responsables de différentes affections incluant cancers, stérilité, retard de développement, neuropathies ou encore baisse des fonctions immunitaires. Les études épidémiologiques permettant de mettre en évidence les relations entre les expositions et le développement des différents troubles nécessitent l'utilisation de marqueurs d'exposition comme les dosages sur matrices biologiques. Parmi elles, les urines, classiquement utilisées, et les cheveux, considérés comme une matrice d'avenir, sont les prélèvements biologiques les plus intéressants.

Le projet EvExPe visait ainsi à améliorer les outils de diagnostic de l'exposition aux pesticides que sont les dosages de résidus de pesticides dans les urines et les cheveux. Le premier objectif concernait l'identification des possibilités respectives de chacune des deux matrices pour le dosage des différents résidus. Ensuite, l'optimisation du traitement pré-analytique et des stratégies de prélèvement des échantillons devait permettre d'éviter la plupart des biais représentant les limitations relatives à l'utilisation de ces outils. Le dernier aspect de développement visait à établir une relation de type « effet-dose » permettant d'évaluer quantitativement, à l'aide d'un modèle animal, le niveau d'exposition des individus à partir des résultats d'analyse des prélèvements biologiques. Enfin, l'application des approches développées à des échantillons biologiques humains avait pour objectif de documenter l'exposition des individus à partir de ces deux types de prélèvements.

Méthodes

La première étape consistait au développement de méthodes de dosage multi-résidus de pesticides, incluant à la fois des composés parents et leurs métabolites/produits de dégradation dans les matrices urines et cheveux. Cette étape visait ainsi à optimiser le traitement pré-analytique des échantillons biologiques avant l'analyse des extraits obtenus. L'approche analytique développée visait à développer des méthodes aussi similaires que possible pour les deux matrices malgré la nature différente des échantillons (solide vs liquide), afin de réaliser ultérieurement une comparaison objective des performances de ces deux matrices en termes de biomonitoring.

Une autre étape du développement analytique concernait un aspect spécifique à la matrice cheveux : la mise au point d'un protocole de décontamination des échantillons. Ce traitement pré-analytique, limitant les biais d'interprétation liés au dépôt éventuel de pesticides sur le cheveu, permet une interprétation des résultats basée uniquement sur les composés incorporés à la matrice lors de processus biologiques, et donc représentatifs de la dose interne des individus.

Le projet EvExPe visait également à établir une relation de proportionnalité entre le niveau d'exposition aux pesticides des individus et la concentration de ces molécules ou de leurs métabolites dans les cheveux. Des animaux (rats) ont été exposés par gavage à un cocktail de 20 pesticides selon un schéma représentatif d'une exposition chronique (3 fois par semaine pendant une durée de 90 jours). Les poils des animaux collectés à J90 ont été analysés à l'aide des méthodes développées dans ce projet. ---

--- La comparaison des résultats de dosages sur les deux matrices, intégrant notamment l'influence de la vitesse d'élimination urinaire des composés, a été réalisée en appliquant les méthodes analytiques développées dans ce projet à l'analyse de prélèvements biologiques provenant de 31 volontaires humains (15 femmes et 16 hommes). Un prélèvement de cheveux a également été collecté au même moment chez chacun des participants afin d'effectuer la comparaison entre les deux matrices.

En dernier lieu, les approches développées dans le cadre du projet ont été appliquées à l'analyse de couples d'échantillons urines/cheveux provenant d'une cohorte de femmes enceintes. Les échantillons biologiques (cheveux et urines) analysés ici, fournis par l'InVS et l'INED, provenaient de l'étude pilote réalisée dans le cadre de l'étude ELFE (Etude Longitudinale Française depuis l'Enfance). Les prélèvements biologiques ont été collectés dans différentes régions Françaises (Seine-Saint-Denis, Ardèche, Isère, Loire et Savoie).

Principaux résultats obtenus et applications envisageables, lien au plan Écophyto

Le travail réalisé a permis de mener à bien l'objectif du développement analytique d'une méthode de dosage multi-résidus de pesticides dans des prélèvements de cheveux et d'urines. Une partie du travail de développements analytiques, portant sur la comparaison de différentes procédures de purification d'extraits obtenus à partir de prélèvement de cheveux a permis d'identifier les stratégies à adopter pour les différentes familles de composés recherchés [1]. Le développement parallèle des méthodes d'analyse des pesticides dans les urines et cheveux a permis de fournir une approche permettant une comparaison objective et non biaisée des performances des deux matrices quant à l'évaluation de l'exposition [2]. La mise au point d'une procédure de décontamination des prélèvements de cheveux avant leur analyse a permis de pallier l'absence de procédure standardisée dans ce domaine [3]. Cette avancée devrait ainsi permettre une utilisation optimale de cette matrice pour documenter l'exposition chronique aux polluants en évitant des biais d'interprétation des résultats.

L'expérimentation animale a mis en évidence la relation de proportionnalité existant entre le niveau d'exposition des animaux et les concentrations retrouvées dans leurs poils pour la plupart des molécules étudiées (exemple en Figure 1).

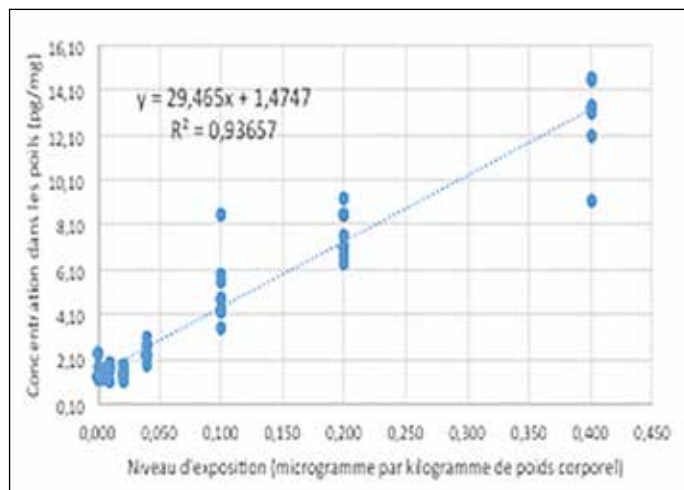


Figure 1. Mise en évidence de la relation de proportionnalité entre le niveau d'exposition des rats et la concentration en Fipronil dans leurs poils après 90 jours d'exposition.

Les résultats obtenus suggèrent la possibilité de déterminer les niveaux moyens d'exposition des individus à partir de la concentration en polluants détectée dans leurs cheveux. La publication de ces résultats devrait également représenter une référence significative dans le domaine de l'analyse de cheveux, en particulier, mais également du biomonitoring, en général [4].

L'étude de toxico-cinétique des pesticides dans les urines a montré la forte variabilité existant au niveau des concentrations urinaires des différents composés (pesticides parents et métabolites) et de souligner les incertitudes quant à l'utilisation de cette matrice. Cette étude a établi qu'un prélèvement unique d'urine ne suffisait *a priori* pas à rendre compte de l'exposition des sujets. La comparaison avec les résultats obtenus après l'analyse des prélèvements de cheveux auprès des mêmes volontaires a également montré la complémentarité de ces deux matrices quant à la nature des composés détectables dans chacune d'elles [5].

Les résultats obtenus à partir de l'analyse des échantillons d'urines et de cheveux collectés auprès des femmes enceintes ont pu mettre en évidence l'exposition multiple des sujets. Le résultat principal concerne le nombre significativement plus élevé de composés détectés dans les prélèvements de cheveux par rapport aux urines. Cette information représente une avancée dans le domaine de la biosurveillance et devrait permettre de soutenir l'utilisation de la matrice cheveux pour l'évaluation de l'exposition des sujets dans de futures études épidémiologiques. ■

Conclusions et perspectives

Les résultats produits dans le cadre du projet EvExPe ont permis la mise au point de procédures pouvant être standardisées pour le prélèvement et le traitement des échantillons biologiques (urines et cheveux) destinés à l'évaluation de l'exposition humaine aux pesticides. En identifiant les différents composés (pesticides parents ou métabolites) détectables dans les matrices urine et cheveux, ces travaux devraient permettre d'orienter les démarches vers la stratégie la plus adéquate pour l'évaluation des expositions aux différents résidus ou familles de résidus de pesticides. L'analyse des échantillons biologiques humains a d'autre part mis en évidence l'exposition cumulée à un grand nombre de pesticides différents des individus, fournissant ainsi une information réaliste et pertinente pour de futures études de toxicité intégrant l'aspect synergétique potentiel des co-expositions.

A terme, les avancées obtenues ici devraient fournir des outils plus performants que ceux existants actuellement pour l'évaluation de l'exposition humaine. Ces outils pourront avantageusement être utilisés dans le cadre d'études épidémiologiques visant à relier les expositions aux troubles de la santé.

Références bibliographiques

- > [1] Duca R.D., Salquebre G., Hardy E., Appenzeller B.M.R., 2014. Comparison of solid phase- and liquid/liquid-extraction for the purification of hair extract prior to multi-class pesticides analysis. *J Chromatogr B*. 955-956:98-107.
- > [2] Hardy E.M., Duca R.D., Salquère G., Appenzeller B.M.R., 2014. Multi-residue analysis of organic pollutants in hair and urine for matrices comparison. *Forensic Sci Int*. 249C:6-19.
- > [3] Duca R.D., Hardy E., Salquère G., Appenzeller B.M.R., 2014. Hair decontamination procedure prior to multi-class pesticide analysis. *Drug Testing and Analysis*. 6:55-66.
- > [4] Appenzeller B.M.R., Hardy E., Grova N., Chata C., Salquère G., Briand O., et al., in preparation. 2015. Hair analysis for the biomonitoring of pesticide exposure – comparison with blood and urine in an animal model.
- > [5] Appenzeller B.M.R., Hardy E., Legrand R., Leite S., Sauvageot N., Duca R.D., 2015. Comparative assessment of human exposure to pesticides by urine and hair analysis. 20th meeting of the Society of Hair Testing, May 3-6, Sao Paulo, Brazil.