

# Nouvelle méthode globale d'évaluation de l'exposition aux pesticides par l'échantillonnage et l'analyse des eaux usées

Jean-Christophe GARRIGUES | jean-christophe.garrigues@chimie.ups-tlse.fr

CNRS - Laboratoire IMRCP, UMR5623 - Toulouse

Mots clés : Biomarqueurs, Pesticides, eaux usées, épidémiologie, exposition

La population mondiale est exposée aux pesticides par l'alimentation, l'utilisation domestique, l'usage professionnel ou par une exposition environnementale dans les zones de cultures. Les effets de cette exposition sur la santé sont nombreux. En 2008, Barr a montré un lien entre l'analyse du taux d'agents chimiques ou de leurs métabolites, dosés dans différents tissus ou fluides biologiques et des effets sur la santé (1). Ces études permettent de suivre non pas l'agent chimique parent, mais ses produits de dégradation (métabolites), qui se retrouvent dans plusieurs fluides biologiques comme le sang, le plasma ou l'urine. En 2003 Wessels et coll. ont montré (2) l'intérêt des analyses de métabolites de pesticides dans les urines pour évaluer l'exposition humaine. On y retrouve ces métabolites en concentration plus élevée que dans les autres fluides et ces prélèvements non invasifs sont simples à mettre en œuvre. La relation entre les taux de métabolites dans les urines et l'exposition a été évaluée par des études successives menées sur plusieurs échantillons de population : personnes non exposées directement, agriculteurs, ouvriers. Une des limitations de cette méthodologie individuelle, est la taille de l'échantillon nécessaire pour que les prélèvements soient représentatifs d'une population exposée, en minimisant les différences de métabolismes individuels. Les deux publications sélectionnées dans cette note montrent les avancées obtenues dans le domaine de l'évaluation de l'exposition aux pesticides, utilisant la méthodologie de suivi des métabolites, non pas dans les urines individuelles, mais dans les eaux usées. La première publication de cette note montre la méthodologie analytique développée par Rousis et al. (2016). Une préparation d'échantillons SPE\* permet de concentrer les métabolites les plus hydrophobes, avant de les analyser sur un système LC-MS/MS\*. Cette méthode permet de déterminer les taux de métabolites retrouvés dans les eaux usées et la fréquence d'apparition. La seconde publication des mêmes auteurs (2017) montre la méthodologie développée pour évaluer l'exposition d'une population aux pyréthroides\* à partir des taux de métabolites retrouvés dans les eaux usées. Cette méthodologie a permis aux auteurs de réaliser la première étude épidémiologique par le suivi du taux de métabolites de pesticides dans les eaux usées urbaines en Italie.

## Mesure de l'exposition aux pesticides d'une population, par la quantification de leurs métabolites urinaires dans les eaux usées urbaines par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem : une nouvelle approche de bio-surveillance

Rousis NI. et al. (2016). Monitoring population exposure to pesticides based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry measurement of their urinary metabolites in urban wastewater: A novel biomonitoring approach, *Sci Total Environ*; vol.(571):p.1349-1357.

### Résumé

L'étude montre la première application analytique permettant de quantifier des métabolites urinaires de pesticides dans les eaux usées issues de station d'épuration. Les auteurs ont sélectionné trois classes de pesticides : les triazines\*, les organo-phosphorés\* et les pyréthroides. Ces trois familles de pesticides ont été étudiées par Yusa et coll. en 2015 (3), avec l'identification des principales voies de métabolisation et de dégradation environnementale ainsi

que la stabilité des métabolites dans les urines. A partir de ces données bibliographiques, les auteurs ont retenu 14 métabolites stables et produits uniquement par le métabolisme humain ou pour certains, produit également par l'environnement, mais étant représentatifs de l'exposition humaine. Pour les triazines c'est l'atrazine (ATZ) et cinq de ses métabolites, qui ont été retenus : déséthyl atrazine (DEA), déséthyl tributyl atrazine (DES), désisopropyl atrazine (DIA), diamino chloro atrazine (DACT), atrazine mercapturate (AM). Pour les pyréthroides (PYR), l'acide 3-phenoxybenzoïque (3-PBA) a été retenu car il est le métabolite majoritaire issu de 20 molécules de synthèses différentes. Un autre métabolite est également recherché le dichlorovinyl diméthyl cyclopropane acide carboxylique (cis et trans DCCA), caractéristique de l'exposition à la perméthrine\*, cyperméthrine\* et cyfluthrine\*. Pour les insecticides organophosphorés (OP), les métabolites du chlorpyrifos (CPF), chlorpyrifos méthyl (CPF-MET) et malathion (MAT) sont recherchés : trichloro pyridinol (TCPY), malathion acide monocarboxylique (MMA), malathion acide dicarboxylique (MDA), isopropyl méthyl pyrimidol (IMPY), diéthyl phosphatate (DEP), diéthyl thiophosphatate (DETP), diméthyl phosphatate (DMP), diméthyl thiophosphatate (DMTP). La prise d'échantillons a été réalisée

dans les stations d'épuration de sept villes en Italie. L'eau brute est collectée en entrée de station. Pour chaque analyse, 600 mL d'eau sont prélevés et congelés. Chaque échantillon est filtré avant extraction sur phase solide (SPE). Pour chaque extraction, 50 mL d'eau est nécessaire et après évaporation du solvant d'extraction, 100 µL d'eau ultra pure et des standards isotopiques\* de chaque métabolite sont ajoutés avant injection dans un système LC-MS/MS. Pour les métabolites les plus polaires (DEP, DETP, DMP et DMTP), non retenus par les cartouches de SPE, une injection directe est réalisée. Le système développé permet d'atteindre des limites de quantifications (LOQ) comprises entre 5 et 15 ng/L pour la majorité des métabolites. Pour les métabolites des OP (DEP, DETP, DMP et DMTP) détectés par injection directe, les LOQ sont comprises entre 0.06 et 0.79 µg/L. L'étude de stabilité a montré que la majorité des métabolites sont stables après deux mois de présence dans des eaux usées stockées à -20°C, à l'exception de DCCA totalement dégradé et deux métabolites de l'atrazine AM et DIA dont les taux augmentent de 34% et 24%. La méthode a été appliquée à l'étude de 44 échantillons d'eaux usées prélevées en mai 2014. Les résultats ont montré l'absence de détection pour CPF-MET, AM et DMTP. Les métabolites les plus détectés sont DES, TCPY, 3-PBA, DMP et DEP, retrouvés dans tous les échantillons. Le trans DCCA est retrouvé dans 97% des échantillons, le cis DCCA 73%, IMPY 77 et ATZ 57%. Tous ces métabolites sont retrouvés avec des concentrations comprises entre 1 ng/L et 1.6 µg/L. Les plus fortes concentrations en métabolites sont observées pour DMP, DEP et DETP.

### Commentaire

L'étude montre la présence de fortes concentrations en métabolites d'OP, comme montré par Heudorf et coll. en 2001, dans des prélèvements d'urines individuels (4). Dans cette précédente étude DMTP est retrouvé à forte concentration, mais non détecté ici. DMP et DEP sont deux des six métabolites les plus fréquemment retrouvés dans la littérature, comme dans les résultats de cette publication. Dans ce travail, les auteurs se sont intéressés à des métabolites plus spécifiques de CPF et CPF-MET. TCPY est retrouvé dans tous les échantillons à une concentration comprise entre 12 et 280 ng/L, comme présenté dans les travaux de Barr et coll. (1). La même remarque peut être faite pour IMPY. Pour MMA, la fréquence de détection est faible montrant une faible exposition au MAT. Pour les PYR, 3-PBA est retrouvé dans tous les échantillons, montrant une forte exposition, en accord avec les travaux de Heudorf (4) et Barr (1). Dans ces précédents travaux, la fréquence de détection approchait 90% et la concentration >180 ng/L montrait une forte exposition aux PYR. Pour les métabolites de ATZ, interdite dans l'Union européenne depuis 2004, les métabolites ne sont retrouvés que sporadiquement à l'état de trace, excepté pour DES qui est retrouvé dans tous les échantillons de cette étude à une concentration élevée (20 ng/L). Ces résultats sont en accord avec l'étude de Meffe et coll. (5) montrant l'ubiquité de ce métabolite dans les eaux de surface. En revanche ces résultats confirment que ce métabolite n'est pas exclusivement apporté par le métabolisme humain d'ATZ et que d'autres voies de dégradation du pesticide existent dans l'environnement.

Cette méthodologie analytique est une avancée dans le domaine. Elle permet le suivi d'une population de plusieurs milliers de personnes à partir d'un seul prélèvement. Il convient de réaliser des études complémentaires, notamment sur la stabilité des métabolites et sur les éventuelles autres sources environnementales qui peuvent interférer dans la mesure de l'exposition, afin de confirmer le choix des biomarqueurs spécifiques des pesticides parents. La méthode est globale et peut être étendue à de nombreux agents chimiques.

### Epidémiologie de l'exposition humaine aux pesticides pyréthroides par l'étude des eaux usées.

Rousis NI. et al. (2017). Wastewater-based epidemiology to assess human exposure to pyrethroid pesticides. *Environ Int*, vol.(99): p.213-220.

### Résumé

Le suivi de l'exposition aux pesticides est généralement assuré par des études épidémiologiques qui recherchent différents biomarqueurs\* de ce contact dans la population. L'exposition est évaluée par la mesure des métabolites spécifiques des pesticides tracés dans les fluides (urine, sérum ...) des personnes suivies, regroupées dans des cohortes importantes (6). Le travail de collecte et d'analyse de ce très grand nombre d'échantillons individuels est très important et constitue une limite aux études épidémiologiques individuelles (7). Les auteurs ont donc choisi d'appliquer une nouvelle méthodologie permettant de quantifier des métabolites urinaires de pesticides dans les eaux usées issues de station d'épuration dans une étude épidémiologique à l'échelle d'un pays. La méthodologie analytique est présentée dans la première publication de cette note. Le principe retenu pour l'appliquer à une étude épidémiologique est que tout pesticide en contact avec un individu va être métabolisé et rejeté par les urines. Le taux de métabolites retrouvé dans les eaux est relié par un facteur de correction (CF) mesuré à partir du ratio de la masse molaire (Mw) du pesticide étudié par Mw du métabolite spécifique sur la masse moyenne de métabolite rejetée dans les eaux usées (Wm). L'objectif de cette étude est de montrer que la méthode de dosage des métabolites dans les eaux usées est adaptée à la mesure de l'exposition globale d'une population à une classe de pesticides : les pyréthroides. Pour ce faire deux métabolites ont été recherchés : l'acide 3-Phenoxybenzoïque (3-PBA) et le dichlorovinyl diméthyl cyclopropane acide carboxylique (cis et trans DCCA). Ces métabolites ont été retenus de par leurs fréquences de détection et leurs concentrations élevées dans les urines de prélèvements individuels (4). Les prélèvements ont été effectués dans 6 villes en Italie en mai 2014. Pour une ville des prélèvements complémentaires ont été effectués de février à septembre 2015, afin d'évaluer l'exposition saisonnière. La concentration en métabolite (Cm) est mesurée sur un système LC-MS/MS. La masse moyenne de métabolites rejetés Wm est calculée en multipliant Cm par le débit d'eau usée de chaque station. La charge journalière est alors normalisée par le nombre d'habitant de chaque ville pour permettre une étude

comparative (mg/jour/1000 habitants). A partir de ces données (WIm et CF) le taux d'exposition aux pyréthrinés est calculé pour chaque population. La charge journalière la plus élevée (en mg/jour/1000 habitants) est mesurée à 130.6 pour le 3-PBA, 160.2 pour le trans DCCA et 61.6 pour le cis DCCA. À partir des résultats obtenus avec le 3-PBA, l'exposition aux pyréthroïdes est calculée à un taux de 907.5 mg/jour/1000 habitants pour la plus forte exposition. Pour la majorité des villes, l'exposition est plus faible, de l'ordre de 260 mg/jour/1000 habitants. À partir du cis et trans DCCA, l'exposition ciblée à la perméthrine, cyperméthrine et cyfluthrine est évaluée. Les valeurs varient de 29 à 588 mg/jour/1000 habitants.

### Commentaire

L'étude montre la possibilité d'évaluer l'exposition aux pesticides pyréthroïdes à partir de la mesure des taux de métabolites retrouvés dans les eaux usées des stations d'épuration. Les biomarqueurs retenus sont spécifiques d'une famille de 20 pyréthroïdes (3-BPA) ou de trois molécules spécifiques (cis et trans DCCA). Les concentrations retrouvées dans les eaux usées pour ces trois métabolites sont en accord avec les valeurs individuelles de la littérature (3). Pour les PYR, les auteurs ont déterminé l'exposition moyenne journalière et l'ont comparée à la dose journalière admissible (DJA) de la cyfluthrine (0.03 mg/jour/kg). Les résultats montrent que l'exposition aux PYR a représenté entre 13 et 439% de la DJA sur la période mesurée. La méthode développée par les auteurs pour évaluer l'exposition utilise un CF qui doit être affiné en fonction des données de la littérature correspondant aux différentes voies d'exposition. En effet, Morgan et col. (8) ont montré que les voies d'exposition sont représentées par l'alimentation avec notamment la quantité de végétaux consommés et l'exposition indirecte par la peau et l'inhalation de pesticides à usage agricole, vétérinaire ou domestique. Les auteurs utilisent toutes les données bibliographiques disponibles pour améliorer ces CF, mais les résultats sont encore trop limités en nombre de personnes évaluées. L'étude menée par Garcia Lorca et al. (9) a montré la variabilité observée dans la mesure de l'exposition en fonction de paramètres environnementaux et individuels et souligne l'importance de mener des études globales sur ces facteurs. Des études complémentaires sont à envisager pour affiner ces CF. De même la présence de métabolites de ces pesticides dans l'alimentation n'est pas systématiquement recherchée et ces métabolites peuvent provenir de l'exposition et/ou de l'environnement. La recherche de métabolites stables uniquement métabolisés suite à une exposition humaine ou animale est une démarche à initier dans les contrôles qualités en lien avec l'alimentation. Cette méthodologie épidémiologique est une avancée dans le domaine. Elle est globale, spécifique ou à large spectre suivant les métabolites recherchés et permet des mesures de variation spatiales et temporelles et permet de mesurer un risque pour la santé par la comparaison des doses moyennes d'expositions avec la DJA réglementaire.

### CONCLUSION GÉNÉRALE

Les auteurs ont développé une méthodologie analytique permettant la recherche de métabolites de pesticides dans les urines prélevées dans les eaux usées de stations d'épuration. L'étude a montré la stabilité de beaucoup de ces métabolites dans ces rejets. Plusieurs classes de pesticides ont été suivies à partir d'un seul prélèvement : OP, ATZ, PYR. Dans la seconde publication analysée, les auteurs ont montré l'application de cette méthodologie à une étude épidémiologique à l'échelle d'un pays : l'Italie. Cette étude montre une forte exposition de la population aux OP. Cette exposition est relevée par la présence de DMP et DEP dans tous les échantillons d'eaux usées. ATZ, interdite dans l'union Européenne depuis 2004 est retrouvée dans plus de la moitié des échantillons. En revanche pour ses métabolites, DES est retrouvé dans tous les échantillons alors que les autres métabolites sont retrouvés sporadiquement et en quantité très faible. Un point important des résultats de ces deux études concerne la mesure de l'exposition aux pyréthroïdes. L'utilisation de cette classe d'insecticide est en constante augmentation et représente aujourd'hui la plus importante source de pollution en agriculture et usage domestiques (10). Avec cette méthode, les auteurs ont également évalué un risque pour la santé en comparant les doses d'exposition aux DJA. Cette approche globale permet d'apporter une réponse aux recommandations de l'Anses concernant le développement de méthodes d'évaluation de l'exposition intégrée, prenant en compte toutes les sources et les voies de contamination (11).

## GENERAL CONCLUSION

The authors developed an analytical methodology for the monitoring of pesticides metabolites collected in urban wastewater. This study showed the stability of many of these metabolites in raw wastewater. Several classes of pesticides were followed with only one sample: OP, ATZ, PYR. In the second analyzed publication, the authors showed the application of this methodology to an epidemiological country scale study in Italy. This study shows a high level of exposure for the population to OP. This exposure is raised by the presence of DMP and DEP in all the wastewater samples. ATZ, prohibited in the European Union since 2004 is found in more than half of the samples. On the other hand, DES is found in all the samples whereas the other metabolites are found sporadically and in very small quantity. An important point found in the results of these 2 studies is the measurement of the pyrethroid exposure. The use of this insecticide class is in constant increase and represents today the most important source of pollution in agriculture and domestic use (10). With this method, the authors also calculate a risk assessment by comparing the mass loads to ADI. This comprehensive approach allows to bring an answer to the ANSES recommendations concerning the development of methods for the evaluation of human exposure, considering all the sources and the ways of contamination (11).

## Lexique

**Biomarqueur** : Modification moléculaire, biochimique, cellulaire ou physiologique, qui révèle l'exposition d'un organisme vivant à un agent chimique.

**Cyfluthrine, cyperméthrine, perméthrine**: Insecticides de synthèses de la famille des pyréthroïdes

**LC-MS/MS** : Chromatographie liquide couplée à un détecteur de spectrométrie de masse en tandem.

**Organophosphorés** : molécules ayant une liaison carbone-phosphore, pour les pesticides se sont généralement des insecticides ou herbicides

**Pyréthroïdes** : Insecticides de synthèses dérivés de l'acide chrysanthémique retrouvé dans le pyrèthre sauvage.

**SPE** : extraction en phase solide, méthode de préparation de l'échantillon permettant de séparer les éléments d'un mélange par adsorption sélective.

**Standards isotopiques** : Molécules pure utilisées en chimie analytique dans laquelle certains atomes  $^1\text{H}$  ou  $^{12}\text{C}$  sont remplacés par un isotope stable (deutérium ou  $^{13}\text{C}$ ).

**Triazines** : Famille de produits chimiques constitués d'un hétérocycle comprenant trois atomes d'azote regroupant trois désherbants (atrazine, simazine, terbuthylazine).

## Publications de référence

**1 Barr DB**, Biomonitoring of exposure to pesticides. *J. Chem. Health Saf.* 2008;15:20–29.

**2 Wessels D, Barr DB, Mendola P**, Use of biomarkers to indicate exposure of children to organophosphate pesticides: implications for a longitudinal study of children's environmental health. *Environ Health Perspect* 2003;111(16):1939–1946.

**3 Yusa V**, et al. Occurrence of biomarkers of pesticide exposure in non-invasive human specimens. *Chemosphere* 2015;139:91–108.

**4 Heudorf U, Angerer J**, Metabolites of pyrethroid insecticides in urine specimens: current exposure in an urban population in Germany. *Environ Health Perspect* 2001;109(3):213–217.

**5 Meffe R, de Bustamante I**, Emerging organic contaminants in surface water and groundwater: a first overview of the situation in Italy. *Sci Total Environ* 2014;481:280–295.

**6 Barr DB** et al. Urinary concentrations of metabolites of pyrethroid insecticides in the general U.S. population: National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2002. *Environ Health Perspect* 2010;118:742–748.

**7 Casteleyn L** et al. A pilot study on the feasibility of European harmonized human biomonitoring: strategies towards a common approach, challenges and opportunities. *Environ Res* 2015;141:3–14.

**8 Morgan MK** et al. An observational study of 127 preschool children at their homes and daycare centers in Ohio: environmental pathways to cis- and trans-permethrin exposure. *Environ Res* 2007; 104:266–274

**9 Gracia-Lor E** et al. Refining correction factors for back-calculation of illicit drug use. *Sci Total Environ* 2016;573:1648–1659.

**10 Saillenfait AM** et al. Pyrethroids: Exposure and health effects – An update *Environ Health A Int. J. Hyg. Envir. Heal* 2015;218:281-292.

**11 Anses**. Exposition de la population générale aux pesticides. Bilan des connaissances disponibles et recommandations 2014; <https://www.anses.fr/fr/content/exposition-de-la-population-g%C3%A9n%C3%A9rale-aux-pesticides>.

## Revue de la littérature

**Kim KH, Kabir E, Jahan SA**. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Sci Total Environ* 2017;575(1):525-535

**Ye M** et al. Pesticide exposures and respiratory health in general populations. *J Environ Sci* 2017;51:361-370.

**Masiá A** et al. Determination of pesticides and veterinary drug residues in food by liquid chromatography-mass spectrometry: A review. *Anal Chim Acta* 2016 ;936(14)40-61.

**Liens d'intérêts :**

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt.