THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)*
Discipline ou Spécialité : *Pathologie, toxicologie, génétique et nutrition*

Présentée et soutenue par : Nathalie BONVALLOT
Le : 13 juin 2014

Application de la métabolomique à l'étude du lien entre les expositions environnementales aux pesticides pendant la grossesse et le développement de l'enfant : approches épidémiologique et toxicologique

---

JURY
Xavier Coumoul, rapporteur
Marc-Emmanuel Dumas, rapporteur
Jean-Philippe Antignac, examinateur
Isabelle Baldi, examinateur
Jean-Pierre Cravedi, INRA UMR 1331 Toxalim Toulouse, Directeur de thèse
Sylvaine Cordier, INSERM UMR 1085 IRSET Rennes, Co-directrice de thèse

---

Ecole doctorale : SEVAB, Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries
Unité de Recherche : INRA UMR 1331 TOXALIM, Toulouse
Directeurs de Thèse : Jean-Pierre Cravedi, Sylvaine Cordier
Rapporteurs : Xavier Coumoul, Marc-Emmanuel Dumas

Application de la métabolomique à l'étude du lien entre les expositions environnementales aux pesticides pendant la grossesse et le développement de l'enfant : approches épidémiologique et toxicologique

NATHALIE BONVALLOT

Ecole doctorale : SEVAB, Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries
Unité de Recherche : INRA UMR 1331 TOXALIM, Toulouse
Directeurs de Thèse : Jean-Pierre Cravedi, Sylvaine Cordier

REMERCIEMENTS

J'exprime mon entière reconnaissance aux Dr. Xavier Coumoul et Marc-Emmanuel Dumas pour avoir accepté de juger mon travail en qualité de rapporteurs. Je remercie également Isabelle Baldi et Jean-Philippe Antignac pour leur participation en tant que membres du jury.

Mes remerciements les plus sincères vont ensuite à Sylvaine Cordier pour m'avoir suggéré de travailler sur ce sujet de recherche et avoir accepté la co-direction de cette thèse, pour sa disponibilité et ses conseils précieux. Je remercie aussi vivement Jean-Pierre Cravedi, directeur de thèse, pour son soutien, ses conseils, sa bonne humeur et pour avoir beaucoup mis « la main à la pâte » dans cette aventure.

Toute ma gratitude va à Bernard Salles et Daniel Zalko pour m'avoir accueillie à l'INRA, et à Denis Zmirou-Navier, Antoine Flahaut et Laurent Chambaud pour m'avoir laissée, en toute indépendance, mener ce projet au DSET&GS de l'EHESP.

Je remercie les membres de mon comité de thèse (Benjamin Blaise, Cléo Tebby, Laurent Debrauwer, Cécile Canlet, Cécile Chevrier) pour le suivi de mes travaux et les précieux conseils qu'ils m'ont adressé au cours de la thèse.

Je tiens également à remercier mes collègues de l'IRSET de Rennes, d'abord Charline Warembourg, pour sa gentillesse et tout le travail réalisé pour les régressions polytomiques, et Cécile Chevrier, Nathalie Costet, et Tania Serrano-Chavez, qui ont participé à l'aventure de mille et une façons et qui sont aussi responsables du succès de celle-ci. Un merci tout particulier aussi à Romain Désert pour son travail efficace de master 2.
Je remercie aussi de tout cœur l'unité Toxalim de Toulouse, et surtout, Roselyne Gautier, pour sa bonne humeur, ses crêpes et autres douceurs, et pour m'avoir appris à préparer les échantillons RMN, Cécile Canlet pour tout le travail réalisé pour l'acquisition et le pré-traitement des spectres, Marie Tremblay-Franco, pour sa disponibilité, m'avoir formée à Simca, et tous ses conseils précieux en statistique, ainsi que Florence Blas-Y-Estrada pour la mise en œuvre de l'expérimentation animale.

Mais je ne voudrais pas oublier non plus Laurent Debrauwer et Emilien Jamin pour les idées lumineuses et les projets associés, toute l'équipe MEX pour les discussions agréables, les conseils, et la bonne humeur du quotidien. Mes remerciements vont également à Véronique Villalon, Suzette Dumoulin et Janette Faramond pour le soutien qu'elles m'ont apporté dans les procédures administratives et la logistique complexe à mettre en œuvre entre Rennes et Toulouse. Enfin, un merci tout particulier pour tous ceux qui ont participé à la journée du 22 avril 2012, Nicolas, Elisabeth, Sandrine, Jérôme, Marc, Florence, Jean-Pierre et Roselyne (encore), et qui sont responsables du succès de l'expérimentation animale.
Mes remerciements vont également à l'EHESP, l'INSERM, l'INRA et le Ministère de l'Environnement pour les financements.

Je remercie également tous mes collègues et ex-collègues du DSET & GS du bas et du haut qui font – ou ont fait – que le travail reste un plaisir, et qui savent apporter un soutien dans les moments de doute, grâce aux discussions de couloir, de cafète ou de cantine et grâce aux nombreux gâteaux que l'on partage au quotidien (merci donc à Philippe, Pierre, Barbara, Ronan, Michèle, Laurent, Betty, Jean-Luc, Nadine, Anne, Béatrice, Olivier, Séverine, Véronique, Cyrille & co). Merci aussi à Imane et Annick pour le soutien apporté lors des recherches de financements.

Je finirais par remercier doublement Marc et Véronique pour le gîte, le transport et le couvert lors de mes déplacements sur Toulouse, pour les discussions scientifiques comme philosophiques des soirées d'été, et pour les conseils apportés. Et infiniment merci à mon conjoint, parents et beaux-parents pour avoir supporté Manon et Lucie lors de mes déplacements fréquents à des moments pas toujours évidents !

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS 1
SOMMAIRE 3
LISTE DES ABBREVIATIONS 5
LISTE DES ILLUSTRATIONS 7
CONTEXTE 9
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GENERALE 15
1. Les pesticides 17
1.1. Classifications et effets biologiques 18
1.2. Utilisation agricole des pesticides en France et en Bretagne 19
1.3. Expositions environnementales aux pesticides 23
1.4. Effets sanitaires des pesticides en population humaine 26
1.4.1. La vulnérabilité fœtale 26
1.4.2. Les effets des pesticides lors d'expositions périnatales 28
1.4.3. L'apport de la toxicologie dans l'étude des mécanismes d'action 32
2. La métabolomique 36
2.1. Définitions : métabonomique, métabolomique et métabolome 36
2.2. L'analyse métabolomique : une approche chimiométrique 38
2.3. Les facteurs de variation des empreintes métaboliques chez l'homme 43
2.4. Les applications actuelles de la métabolomique 45
3. Utilité de la métabolomique en santé environnementale 46
CHAPITRE 2 : OBJECTIFS ET STRATEGIE GENERALE DE LA THESE 71
1. Objectifs de la thèse 73
2. Stratégie générale adoptée 74
CHAPITRE 3 : APPROCHE EPIDEMIOLOGIQUE 77
1. Stratégie d'étude 79
2. Choix de la population d'intérêt 79
3. Choix des groupes d'exposition contrastée 82
4. Analyse de la variabilité humaine dans l'échantillon 84
4.1. Variabilité du profil urinaire liée à l'âge gestationnel 84
4.2. Variabilité du profil urinaire liée à l'indice de masse corporelle 86
5. Utilisation des profils métaboliques urinaires pour décrire des groupes d'expositions aux pesticides chez la femme enceinte en Bretagne 88

6. Discrimination métabolique chez l'enfant à la naissance en fonction des expositions maternelles au cours de la grossesse 99
7. Etude du lien entre proximité aux cultures et expositions aux pesticides (travaux associés) 105
CHAPITRE 4 : APPROCHE TOXICOLOGIQUE 109
1. Stratégie d'étude 111
2. Choix des expositions : pesticides et niveaux de doses 111
3. Choix du protocole expérimental : individus, observations et recueils biologiques 113
4. Suivis des animaux au cours de l'expérimentation animale 114
5. Discrimination métabolique chez des rates gestantes exposées à de faibles doses de pesticides 114
CHAPITRE 5 : DISCUSSION GENERALE 153
1. Approche en population humaine, apport de l'épidémiologie 155
2. Approche expérimentale et suggestion mécanistiques 157
3. Association des démarches épidémiologique et toxicologique 164
CHAPITRE 6 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES 167
1. Conclusion 169
2. Perspectives de recherche 170
2.1. Perspectives à court terme 170
2.1.1. Etude des facteurs de variation du métabolisme humain 170
2.1.2. Confirmation des hypothèses de stress oxydant chez l'Homme 170
2.1.3. Empreintes métaboliques et cocktails de pesticides 171
2.1.4. Amélioration des connaissances mécanistiques 171
2.2. Perspectives à long terme 172
2.2.1. Amélioration des connaissances sur la variabilité du métabolome humain 172
2.2.2. Prédictivité de la métabolomique en santé environnementale 172
2.2.3. Etude des interactions gènes – métabolisme – environnement 173
2.2.4. Approfondissement des données toxicologiques 174
BIBLIOGRAPHIE 177
ANNEXES 197
ANNEXE 1 : Stratégie chimiométrique 199
ANNEXE 2 : Comparaison des caractéristiques maternelles de l'échantillon / cohorte 203
ANNEXE 3 : Pesticides utilisés en Bretagne entre 2001 et 2004 205
ANNEXE 4 : Valorisation 207
ANNEXE 5 : Valorisation associée au projet 223

LISTE DES ABBREVIATIONS

ACP : Analyse en composante principale (PCA en anglais)

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

BBP : Butylbenzylphtalate

BHT : Butylhydroxytoluène

BMRB : Banque de données RMN (*Biological magnetic resonance data bank*)

D_20 : Eau deutérée

DBP : Dibutylphtalate

DDE : Dichlorodiphényldichloroéthylène

DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane

DEHP : Di(ethylhexyl)phtalate

DJA : Dose journalière admissible

DRAAF : Direction Régionale de l'alimentation, de l'agriculture et de la forêt

EHESP : Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique

FID : Signaux de précession libre (*free induction decay*)

HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques

HCB : Hexachlorobenzène

β-HCH : Isomère bêta de l'héxachlorocyclohexane

HDL, LDL, VLDL : Lipoprotéines de haute, faible ou très faible densité (*high density, low density, very low density lipoproteins*)

HMDB : Base de données sur le métabolome (*Human metabolome database*)

IC95 : Intervalle de confiance à 95 %

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

INSERM : Institut National de la Recherche Médicale

InVS : Institut de Veille Sanitaire

LERES : Laboratoire d'Etudes et de Recherches en Environnement Santé

NHANES : Enquête de santé et nutrition américaine (*National Health and Nutrition Examination Survey*)

OPLS: Orthogonal partial least squares

OR : Odds ratio

OSC : Correction orthogonale du signal (*Orthogonal signal correction*)

PELAGIE : Perturbateurs endocriniens: étude longitudinale sur les anomalies de la grossesse, l'infertilité et l'enfance

PLS: Partial least squares

QI : Quotient intellectuel

RCIU : Restriction de croissance intra-utérine

RMN : Résonance magnétique nucléaire

ROS : Dérivés réactifs de l'oxygène (*reactive oxygen species*)

SGA : Faible poids pour l'âge gestationnel (*small gestational age*)

SM : Spectrométrie de masse

TMAO : Oxyde de triméthylamine (*trimethylamine-oxide*)

TSP : 3-triméthylsilyl-1-[2,2,3,3,-$^{2}H_{4}$]-propionate

UHPLC : Chromatographie en phase liquide à ultra-haute performance (*ultra-high performance liquid chromatography*)

VIP : Importance de la variable dans la projection (*variable importance in the projection*)

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Schéma conceptuel des évènements clés se produisant dans l'organisme : de l'exposition à l'effet toxique 11
Figure 2 : Répartition de la surface des exploitations par culture et de l'usage des pesticides en valeur en France en 2006 21
Figure 3 : Représentation géographique des surfaces agricoles en Bretagne en 2000 22
Figure 4 : Usage des pesticides en Bretagne en 2001 22
Figure 5 : Transfert des pesticides dans les compartiments de l'environnement après traitement 24
Figure 6 : Spectre RMN 1H de l'acide hippurique. 42
Figure 7 : Stratégie générale du projet METABOLE 75
Figure 8 : Principales étapes dans l'analyse métabolomique 76
Figure 9 : Projection des observations (variables "semaine") dans le 1er plan obtenu à partir d'un modèle de PLS-DA appliqué aux données filtrées et standardisées (Pareto) 85
Figure 10 : Projections des observations (variable "IMC") dans le 1er plan obtenu à partir d'un modèle de PLS-DA appliqué aux données standardisées (Pareto) 86
Figure 11 : Projection des observations (variables "exposition") dans le 1er plan obtenu à partir d'un modèle de PLS-DA appliqué aux données filtrées et standardisées (Unité) 101
Figure 12 : Voies métaboliques potentiellement modifiées chez l'enfant en lien avec les expositions environnementales prénatales aux pesticides 104
Figure 13 : Suggestion des mécanismes biologiques induits chez des rates gestantes après exposition orale du 4ème au 21ème jour à 8 pesticides utilisés en Bretagne en 2004 159
Figure 14 : Représentation schématique des effets des pesticides sur la mitochondrie 161
Figure 15 : schématisation des liens entre le génome, l'épigénome, le métabolisme et l'environnement 174

Tableau 1 : Exemples de cibles biologiques des pesticides 18
Tableau 2 : Comparaison de la spectrométrie de masse et de la résonance magnétique nucléaire pour le profilage métabolique 40
Tableau 3 : Description de la population des 338 femmes enceintes incluses en 2004 pour lesquelles un échantillon d'urine et de sang de cordon étaient disponibles 82
Tableau 4 : Description de la population de 130 garçons nés de femmes incluses en 2004 100
Tableau 5 : Associations entre les modifications métaboliques sériques chez l'enfant et l'exposition des mères aux pesticides pendant la grossesse 102
Tableau 6 : Exposition orale théorique (ad libitum) en µg/kg/j des rates gestantes du 4ème au 21ème jour de gestation et NOAEL (ou LOAEL) associé 113
Tableau 7 : mécanismes d'action des pesticides au niveau de la mitochondrie 160
Tableau 8 : Principales suggestions mécanistiques faites à l'issue des études toxicologiques de métabolomique en lien avec l'exposition aux pesticides 163

CONTEXTE

La région Bretagne est la première région agricole française, avec plus de 60 % de surfaces dédiées à l'agriculture, dont la majorité concerne les grandes cultures (céréales, maïs, colza, etc.). L'utilisation de pesticides engendre des contaminations des différents compartiments de l'environnement, par les substances mères ou leurs produits de transformation, pouvant conduire à l'exposition de l'Homme de multiples façons (par la voie respiratoire, orale ou cutanée, *via* l'air (gaz et particules), les sols, les poussières), qui viennent s'ajouter aux expositions alimentaires ou domestiques.

Parmi les pesticides utilisés, un certain nombre de molécules sont actuellement suspectées d'être des perturbateurs endocriniens (certains insecticides organophosphorés ou pyréthrinoïdes, certains fongicides ou herbicides ont en effet la capacité d'interférer avec le fonctionnement du système endocrinien, soit par action directe sur les récepteurs hormonaux, soit par modification dans la synthèse, le transport, le métabolisme ou l'excrétion des hormones) (Mnif *et al.* 2011). Pour beaucoup d'insecticides, les mécanismes d'action – bien connus – mettent en jeu des macromolécules indispensables au bon fonctionnement des neurones (acétylcholinestérase, canaux calcium par exemple (Wilson, 2010 ; Soderlund, 2010)). De plus, la toxicité de nombreuses molécules est déjà largement documentée dans des conditions d'expositions élevées chez l'animal et chez l'Homme (intoxications et situations professionnelles surtout) et dans ce cas, les présomptions de liens entre expositions humaines et pathologies sont fortes. Les effets mis en évidence chez les professionnels exposés sont très variés. On peut citer différents types de cancers (lymphomes non hodgkiniens, myélomes multiples, cancer de la prostate) ou des pathologies neurodégénératives (maladie de Parkinson), mais également des fausses couches chez les femmes enceintes exposées professionnellement, et des malformations congénitales ou des leucémies chez l'enfant exposé en période prénatale (INSERM 2013).

En revanche, les résultats des études investiguant les effets liés aux expositions environnementales aux pesticides à faibles doses sont moins bien établis, en particulier lorsqu'il s'agit d'étudier les effets développementaux d'expositions pré- ou périnatales (Shafer *et al.* 2005). Pourtant, le développement intra-utérin et périnatal est un processus

complexe qui rend l'embryon, le fœtus puis le jeune enfant particulièrement vulnérables aux facteurs de l'environnement en raison des modifications morphologiques prenant place au cours du développement, de la croissance et de la maturation de leur organisme. Des modifications à cette période de la vie pourraient conduire à des effets trans-générationnels. Les fonctions de l'organisme atteintes peuvent concerner aussi bien le système reproducteur (exemple du syndrome de dysgénésie testiculaire dont l'existence a été suggérée par Skakkebaek au début des années 2000 (Skakkebaek *et al.* 2006)) que le système neurologique. Par exemple, la modification de neurotransmetteurs au cours du développement pourrait entraîner une perturbation de la différenciation des cellules cérébrales et du développement des synapses (plasticité et fonction), responsable d'effets comportementaux ou cognitifs (Slotkin 2004)). D'ailleurs, de récentes revues de la littérature montrent que même à faible dose, l'exposition prénatale à certains pesticides (en particulier les organophosphorés, les plus étudiés) pourrait conduire à des effets néfastes sur le développement neurologique des enfants, telles qu'une altération du développement cognitif ou une diminution du quotient intellectuel (QI) (Bouchard *et al.* 2011 ; Eskenazi *et al.* 2008 ; London *et al.* 2012).

Aujourd'hui, l'impact des expositions cumulées n'est que peu pris en compte dans les décisions de santé publique car les outils toxicologiques standardisés (OCDE 1981) ne sont pas adaptés à une telle démarche tant il existe de combinaisons de substances possibles et de cas particuliers, et les études épidémiologiques ne permettent pas toujours d'établir un lien indiscutable entre une exposition et un effet chez l'Homme. Le développement de stratégies d'études des mélanges complexes est donc devenu une priorité de recherche, qui peut se déployer selon plusieurs angles non exclusifs. L'utilisation de marqueurs biologiques d'exposition et d'effets précoces est un domaine en plein essor, en particulier depuis le séquençage complet du génome humain et l'arrivée de technologies haut débit, qui ont initialement permis de s'intéresser à l'impact des expositions aux polluants sur l'expression des ARN messagers cellulaires (toxicogénomique fonctionnelle) (Barouki *et al.* 2006). L'amélioration des techniques analytiques permet aujourd'hui de s'intéresser à d'autres types de variations cellulaires, comme le propose la métabolomique. L'intérêt de cette approche est de caractériser de manière globale les modifications métaboliques liées à une exposition donnée. Comme elle identifie les molécules issues du métabolisme (anabolisme

et catabolisme) de l'organisme, elle reflète l'étape ultime de la réponse organique à une exposition (figure 1). Le principe d'analyse dans les fluides biologiques permet de s'intéresser directement à des matrices humaines et d'étudier ainsi les conséquences des expositions environnementales réelles formées de mélanges complexes.

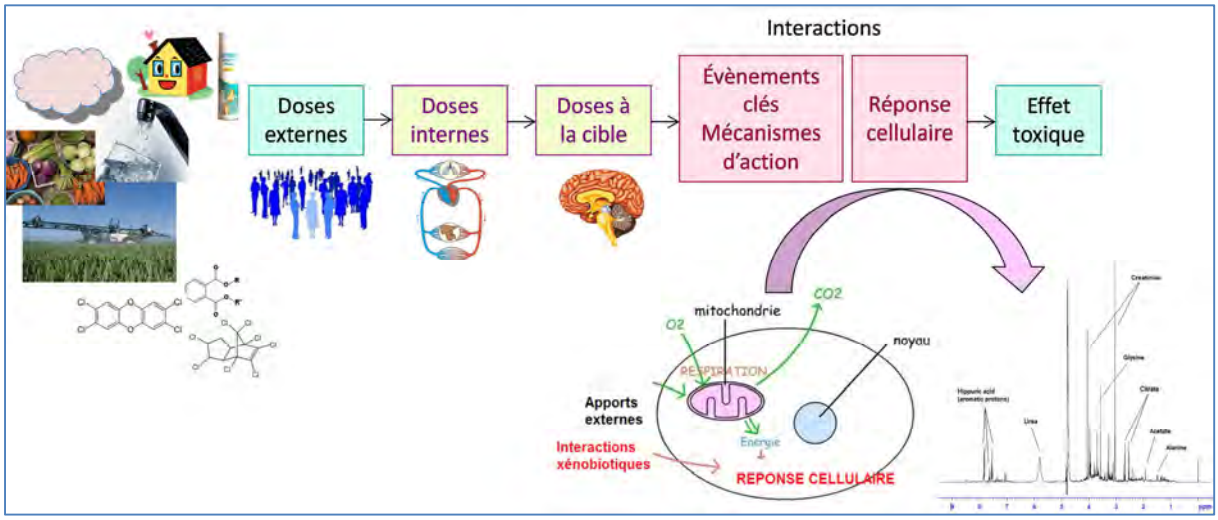


Figure 1 : Schéma conceptuel des évènements clés se produisant dans l'organisme : de l'exposition à l'effet toxique

La recherche en santé environnementale peut se définir, au sens large, comme l'étude des conséquences et des déterminants des expositions liées aux contaminations de l'environnement, incluant l'air, l'eau, les sols, les poussières, les aliments – à l'intérieur comme à l'extérieur, au domicile comme au travail. Dans ce champ disciplinaire, la métabolomique pourrait constituer une approche originale pour l'étude des associations entre expositions multiples et effets subtoxiques. Néanmoins, elle est encore peu développée en raison de la grande variabilité des empreintes métaboliques inter- et intra-individuelle : celles-ci varient en fonction du régime alimentaire, du style de vie, de la médication ou de l'âge par exemple. Nombre de ces facteurs ne sont pas facilement maîtrisables, d'où des difficultés dans l'interprétation des données. Seulement 4 études, toutes récentes, se sont intéressées aux perturbations métaboliques directement chez l'homme. La première est une étude épidémiologique à large échelle incluant plus de 4 000 individus provenant de plusieurs régions culturellement contrastées du monde (Asie, Amérique du Nord, Europe), qui a mis en évidence un lien entre l'alimentation, le profil métabolique et la pression artérielle, facteur de risque des pathologies cardiovasculaires

(Holmes *et al.* 2008). La seconde a observé une augmentation des métabolites impliqués dans les processus inflammatoires et le stress oxydant chez des travailleurs exposés aux fumées de soudure (n = 51) (Kuo *et al.* 2012). La troisième s'est intéressée aux effets liés à l'exposition environnementale au cadmium chez 178 volontaires humains résidant à proximité d'un site industriel, et a pu établir un lien entre l'exposition et l'altération de l'ADN par le stress oxydant (Ellis *et al.* 2012). Enfin, la quatrième a étudié les modifications métaboliques chez 389 travailleurs d'une fonderie exposés à des métaux lourds en Pologne (cadmium, arsenic, plomb) en comparaison à 45 travailleurs non exposés. Les auteurs ont observé une modification des concentrations sériques de lipides (augmentation des VLDL et des acides gras insaturés, diminution des LDL), une augmentation des concentrations sériques de tyrosine, phénylalanine, et 1-méthylhistidine, ainsi qu'une diminution du glutamate. Ils ont suggéré un impact sur le métabolisme énergétique et lipidique, précurseur d'une toxicité hépatique et rénale, en accord avec les données toxicologiques publiées sur les métaux lourds (Dudka *et al.* 2014).

L'utilisation de modèles animaux peut se révéler intéressante car ils permettent la reproductibilité du métabolome grâce à une variabilité inter- et intra-individuelle plus faible. De nombreuses études se sont intéressées à l'impact métabolique de polluants environnementaux (principalement plastifiants et pesticides) sur le rat ou la souris (Bonvallot *et al.* 2014), mais peu d'entre elles se sont intéressées à des expositions proches de celles observées chez l'Homme, tant en termes de complexité que de niveaux de doses. A notre connaissance à ce jour, seules deux études toxicologiques de métabolomique ont investigué des faibles doses de mélanges complexes caractéristiques des expositions humaines. La première concerne l'exposition de souris à un mélange de 6 pesticides fréquemment retrouvé dans les fruits et légumes en France, à des niveaux équivalents à leurs doses journalières acceptables (DJA) respectives. Cette étude a mis en évidence des modifications métaboliques suggérant un stress oxydant et un impact sur la régulation du glucose (Merhi *et al.* 2010). La seconde concerne l'exposition de souris mâles à de l'eau contaminée en hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et en insecticides organochlorés provenant d'un lac qui représente une source majeure de potabilisation de l'eau en Chine. Les observations ont conduit les auteurs à suggérer une altération du métabolisme hépatique énergétique et du métabolisme des acides aminés (Zhang *et al.* 2011).

Ainsi, l'objectif général de ce travail de thèse est de tester l'outil métabolomique dans la compréhension du rôle des expositions environnementales aux pesticides dans le développement de l'enfant. Le projet vise à répondre aux questions suivantes :

- Quelle est l'influence d'expositions de la femme enceinte à de multiples pesticides sur le métabolome de la mère et du nouveau-né ?
- Cette exposition peut-elle être caractérisée par des modifications métaboliques observables ?
- Quels sont les mécanismes expliquant ces modifications ? Quelles seraient les conséquences de ces modifications sur le développement à plus long terme ?

Pour répondre à ces questions, la stratégie adoptée est d'associer une approche épidémiologique humaine et une approche expérimentale chez l'animal[1]. Les données humaines proviennent de la cohorte bretonne mères-enfants PELAGIE suivie par l'INSERM (IRSET UMR 1085). Les études animales et les données qui en découlent ont été produites à l'INRA (Toxalim UMR 1331).

Préalablement à la description de ces travaux, l'introduction générale constitue le premier chapitre. Elle fait un état de l'art sur les pesticides (leurs usages, les effets sanitaires chez l'Homme, et les mécanismes d'action en cause), la métabolomique (définition, méthodes mises en œuvre), et son utilité en santé environnement. Le chapitre 2 introduit ensuite une description approfondie des objectifs du travail de thèse et de la stratégie adoptée (méthode générale).

Les chapitres 3 et 4 décrivent respectivement les résultats obtenus à partir des approches épidémiologique et expérimentale. Le chapitre 5 discute des mécanismes d'action suggérés dans le cadre de l'exposition complexe aux pesticides chez la femme enceinte et tente de faire le lien entre les différentes observations. Enfin, la conclusion décrit principalement les perspectives envisagées pour ce projet.

[1] Le travail de thèse s'est effectué dans le cadre du projet METABOLE [Application de la métabolomique à l'étude du lien entre expositions environnementales aux pesticides pendant la grossesse et développement de l'enfant], projet financé par l'EHESP (2010-2011), l'INRA (2011-2012) et le Ministère de l'Environnement (Grenelle de l'environnement, programme LOLF 189 EXPiOmark 2011-2012).

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GENERALE

1. Les pesticides

Le terme « pesticide » provient du mot anglais « pest » qui désigne tout organisme susceptible d'être nuisible à l'Homme. Ainsi, on entend par « pesticides », les produits formulés par l'Homme destinés à détruire ou repousser les espèces considérées comme indésirables (plantes, animaux, insectes, nématodes, organismes microbiologiques terrestres ou aquatiques, champignons) ou utilisés comme régulateur de croissance, défoliant ou dessicant[2]. Ce terme générique peut être employé dans plusieurs secteurs tels que l'agriculture (pesticides à usage agricole, produits antiparasitaires à usages vétérinaires par exemple) ou l'industrie (biocides antibactériens ou utilisés pour le traitement des charpentes, produits antiparasitaires par exemple). Dans la suite du document, le terme « pesticide » sera restreint aux produits phytosanitaires (usages agricoles mais également domestiques). Les termes « produits phytosanitaires » ou « produits phytopharmaceutiques » ont été introduits en France par la Directive 91/414/CEE du Conseil, du 15 juillet 1991, concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques et abrogée en juin 2011 lors de l'entrée en vigueur du Règlement (CE) n° 1107/2009 du Parlement européen et du Conseil du 21 octobre 2009. Ils correspondent à la traduction du terme anglais « produits de protection des plantes » qui apporte une connotation moins péjorative dans la définition de ces produits. La définition réglementaire est la suivante : « toute substance active ou préparation contenant une ou plusieurs substances actives qui sont présentées sous la forme dans laquelle elles sont livrées à l'utilisateur et qui sont destinées à :

1. protéger les végétaux ou les produits végétaux contre tous les organismes nuisibles ou à prévenir leur action, pour autant que ces substances ou préparations ne soient pas autrement définies ci-après ;
2. exercer une action sur les processus vitaux des végétaux, pour autant qu'il ne s'agisse pas de substances nutritives (par exemple, les régulateurs de croissance) ;
3. assurer la conservation des produits végétaux, pour autant que ces substances ou produits ne fassent pas l'objet de dispositions particulières du Conseil ou de la Commission concernant les agents conservateurs ;

[2] Source : http://www.observatoire-pesticides.gouv.fr

4. détruire les végétaux indésirables ;
5. détruire les parties de végétaux, freiner ou prévenir une croissance indésirable des végétaux. »

1.1. Classifications et effets biologiques

Les pesticides utilisés sont classés en fonction de leur cible biologique :

- Les herbicides, destinés à limiter l'installation d'espèces végétales adventices ;
- Les fongicides, destinés à éliminer les champignons ;
- Les insecticides, destinés à tuer les insectes ou à empêcher le déroulement normal de leur cycle de vie ;
- Les molluscicides, destinés à éliminer les escargots et limaces ;
- Les rodenticides, destinés à éliminer les rongeurs ;
- Les acaricides, destinés à éliminer les acariens.

Compte tenu de l'usage des différentes molécules actives (destruction ou limitation de croissance des organismes biologiques considérés comme ravageurs), celles-ci sont généralement classées selon leur mode d'action sur les systèmes biologiques. Sans être exhaustif, le tableau 1 présente plusieurs des cibles biologiques en fonction des classes de pesticides.

Tableau 1 : Exemples de cibles biologiques des pesticides

Herbicides	Fongicides	Insecticides
Elongases des acides gras Glutamine synthase Tubuline Acétolactate synthase Photosystème II	Tubuline 14α-déméthylase Biosynthèse des phospholipides ARN polymérase ATP synthase	Acétylcholinestérase Canaux sodium Récepteurs acétylcholine ou GABA Glutamate ATP-synthase NADH déshydrogénase

Source : Casida, 2010.

Les insecticides vont altérer la neurotransmission pour perturber le comportement ou la survie des insectes. Par exemple, les organophosphorés et carbamates ont la capacité d'inhiber les acétylcholinestérases, conduisant à une hyperstimulation des récepteurs post-synaptiques cholinergiques, provoquant des syndromes de type muscarinique, nicotinique

ou central (Fukuto 1990). Les pyréthrinoïdes, quant à eux, vont avoir une influence sur la cinétique des canaux sodium voltage dépendant, provoquant une modification du potentiel d'action au niveau des neurones, et conduisant à une diminution de leur seuil d'excitabilité (Soderlund *et al.* 2002). Les fongicides vont agir sur les fonctions cellulaires de base responsables de la croissance. Par exemple, les strobilurines sont capables d'inhiber le complexe mitochondrial III, bloquant la respiration cellulaire alors que les benzimidazoles vont se fixer sur la β-tubuline, inhibant la division cellulaire. Les imidazoles, triazoles et pyrimidines, largement représentés, inhibent la 14α-déméthylase, enzyme impliquée dans la biosynthèse des stérols. Les herbicides inhibent généralement les voies métaboliques des végétaux en bloquant la division cellulaire, la synthèse des acides aminés, des lipides, ou la photosynthèse. Par exemple, les dinitroanilines et les N-phénylcarbamates inhibent la division cellulaire par action sur les tubulines, les aryloxyphénoxypropionates, thiocarbamates et chloroacétamides inhibent la synthèse des lipides par action respective sur l'acétylcoenzyme A ou sur les élongases. Enfin, le glyphosate aura plutôt une action sur la synthèse des acides aminés par inhibition de la 5-énolpyruvique-shikimate-3-phosphate synthétase, ce qui conduit à une perturbation de la synthèse des protéines et provoque un jaunissement des feuilles (Aubertot *et al.* 2005).

1.2. Utilisation agricole des pesticides en France et en Bretagne

L'utilisation de molécules organiques de synthèse à visée pesticides s'est généralisée au début des années 30, après la mise en évidence des propriétés insecticides des thiocyanates et des propriétés fongicides des dithiocarbamates. L'industrie des pesticides a ensuite connu un réel essor avec l'introduction du dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) en 1942. La période qui suit la seconde guerre mondiale (1945-1955) est marquée par la synthèse des molécules de « deuxième génération » considérées comme moins persistantes et moins toxiques (insecticides organophosphorés, carbamates, urées, triazines). La plupart des fongicides seront développés entre 1950 et 1970 avec l'arrivée plus tardive des fongicides systémiques (imidazoles, triazoles, carbamates, pyrimidines) (Fournier 1999). Dans la deuxième moitié du XX^{ème} siècle, la France a développé un système de production agricole fondé sur l'utilisation de pesticides de manière intensive, ce qui a contribué à l'augmentation des rendements et à la régularité de la production.

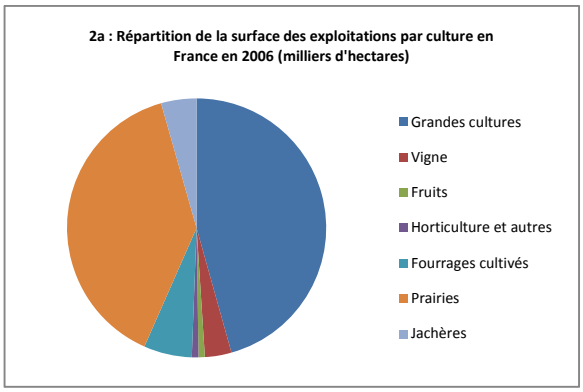
Actuellement, la France est l'un des premiers utilisateurs mondiaux de pesticides. L'utilisation représente depuis une dizaine d'années un peu moins de 80 000 tonnes par an[3]. En 2012, 309 pesticides différents étaient autorisés et commercialisés en France. Ces substances se répartissaient, pour les principaux pesticides, en 46 % de fongicides, 33 % d'herbicides et moins de 5 % d'insecticides (INSERM 2013).

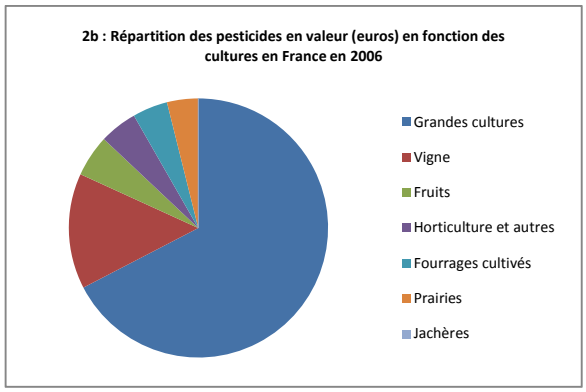
Comme le montre la figure 2, les grandes cultures (céréales, colza, maïs, pommes de terre, betteraves, pois, tournesol) et les prairies représentaient en 2006 une part importante de la surface agricole utile en France (2a). L'emploi des pesticides en euros par hectare incombait pour 67 % à ces cultures (hors légumes) (2b). La consommation en euros par hectare des pesticides est très corrélée à l'indicateur de fréquence de traitement[4] et reflète donc la pression sanitaire à l'échelle du territoire. Les grandes cultures apparaissent comme fortement utilisatrices de pesticides car elles couvrent une grande partie de la surface agricole utile française (45,7 %). Les données de consommation des pesticides ramenées en euros par hectare montrent quant à elles que la pression phytosanitaire la plus forte est liée, localement, aux cultures d'arbres fruitiers, à la vigne et à l'horticulture (les surfaces agricoles concernées sont faibles, mais les fréquences de traitement sont plus élevées) (2c).

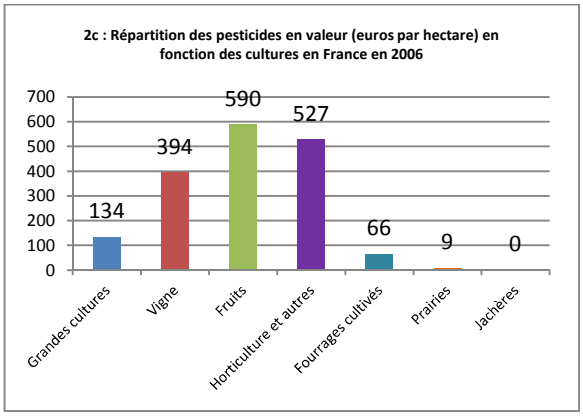
Parmi les grandes cultures, celles qui contribuent le plus à l'utilisation des pesticides sont les céréales, le maïs, le colza et la pomme de terre. Cette contribution varie en fonction des pesticides considérés : par exemple, les céréales sont particulièrement concernées par les herbicides et les fongicides, alors que le colza l'est plus par les insecticides (Guichard 2009).

[3] Source : http://www.developpement-durable.gouv.fr

[4] L'indicateur de fréquence des traitements est mesuré à partir des enquêtes sur les pratiques culturales ; il correspond à la moyenne par hectare du nombre des traitements effectués en produits commercialisés, pondérés par le rapport entre la dose utilisée et la dose homologuée (reflet de la pression phytosanitaire).



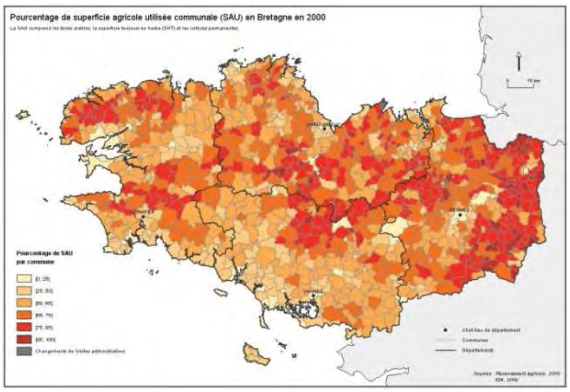




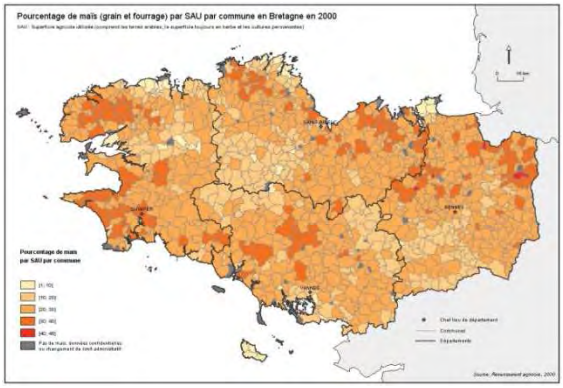
Source : Butault et al. L'utilisation des pesticides en France : état des lieux et perspectives de réduction, 2011. Ministère de l'agriculture.

Figure 2 : Répartition de la surface des exploitations par culture et de l'usage des pesticides en valeur en France en 2006

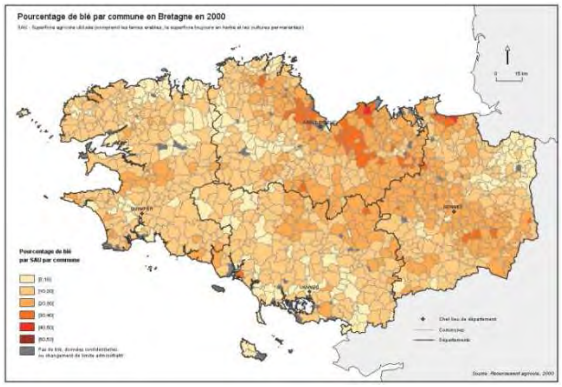
En Bretagne, plus de 60 % des surfaces sont consacrées aux activités agricoles, dont la moitié concerne la culture de céréales et de maïs (figures 3). Dans les années 2000, presque toutes les surfaces cultivées recevaient au moins 4 différents traitements pour contrôler les mauvaises herbes (herbicides), les champignons (fongicides) ou la prolifération des insectes (insecticides). Mille quatre cents tonnes de pesticides ont été utilisés en 2001, avec une surreprésentation des herbicides (plus de 70 % sur le total des matières actives utilisées en masse) (figure 4), qui peut en partie être expliquée par la représentation importante des cultures de maïs et par les conditions météorologiques (Direction Régionale Bretagne de l'alimentation de l'agriculture et de la forêt (DRAAF) 2009).



3a : Pourcentage de superficie agricole utilisée (SAU) communale



3b : Pourcentage de maïs par SAU communale



3c : Pourcentage de blé par SAU communale

Figure 3 : Représentation géographique des surfaces agricoles en Bretagne en 2000, Sources : Recensement Agricole 2000; IGN BdCartho ; cartes réalisées par Tania Serrano-Chavez, INSERM U1085, décembre 2013.

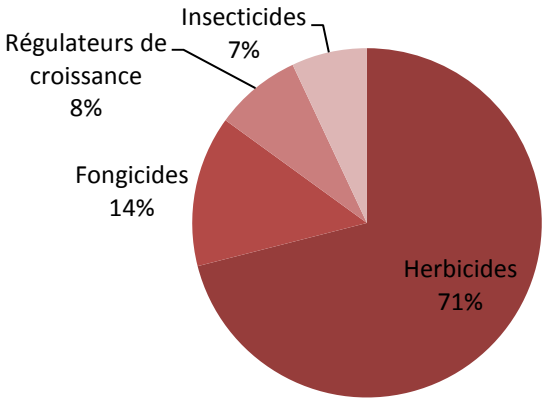


Figure 4 *: Usage des pesticides en Bretagne en 2001, source : DRAAF Bretagne, 2009.*

Les molécules herbicides les plus utilisées entre 2001 et 2004 sur le maïs et le blé étaient l'isoproturon, le bromoxynil, la sulcotrione, le diflufénicanil, l'ioxynil, le nicosulfuron, le phenmédiphame, l'alachlore, l'acétochlore, le prochloraze et le S-métolachlore. Pour les fongicides, en 2004, 100 % des parcelles cultivées en blé recevaient au moins un traitement et le tiers recevaient jusqu'à 3 traitements. Plus de la moitié recevaient de l'époxiconazole, du krésoxym-méthyl, de l'azoxystrobine, du tébuconazole ou du fenpropimorphe. En ce qui concerne les régulateurs de croissance, ce sont surtout le chlorméquat et l'éthéphon qui étaient les plus utilisés sur le blé à cette même période (respectivement 34 % et 14 % des surfaces traitées). Les insecticides du maïs étaient principalement représentés par 3 molécules : le carbofuran, le carbosulfan et le benfuracarbe (Cellule d'orientation régionale pour la protection des eaux contre les pesticides Région Bretagne 2007). En 2006, les principales classes de pesticides utilisées étaient des chloroacétanilides, carbamates, morpholines, triazoles, organophosphorés, ou encore pyréthrinoïdes (DRAAF, 2009).

1.3. Expositions environnementales aux pesticides

Lors des activités agricoles, les pesticides peuvent être appliqués de différentes façons et sous différentes formes en fonction du type de traitement et de la culture traitée (pulvérisation d'aérosols, utilisation de granulés ou de semences traitées…). Les pesticides ainsi que leurs produits de transformation (dégradation environnementale, métabolisme dans les plantes) peuvent alors se retrouver dans les différents compartiments de l'environnement et sont à l'origine de contaminations multiples qui viennent s'ajouter aux pollutions passées (figure 4). Ce transfert est plus ou moins bien connu mais il dépend en grande partie des propriétés physico-chimiques du pesticide et du mode d'application (Rice *et al.* 2007). Ainsi par exemple, lors d'un épandage par pulvérisation, 10 à 70 % de la substance peuvent être perdus au sol, et jusqu'à 50 % dans l'atmosphère (Aubertot *et al.* 2005).

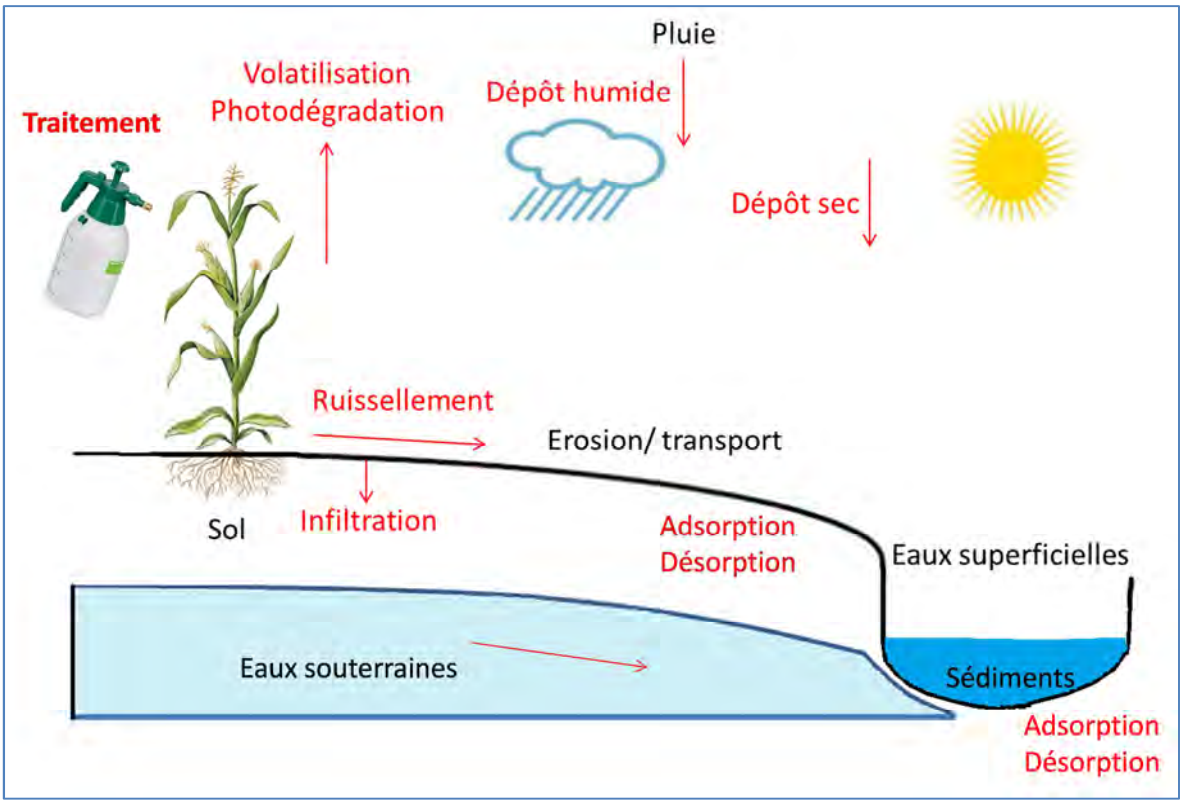


Figure 5 : Transfert des pesticides dans les compartiments de l'environnement après traitement

Ce sont tous les compartiments de l'environnement qui peuvent être contaminés : les sols, l'air, l'eau ainsi que les aliments qui sont produits à partir des végétaux traités. Les contaminations conduisent donc à des expositions humaines complexes, car concernant des centaines de molécules différentes et toutes les voies d'exposition (orale, respiratoire, cutanée). Les expositions alimentaires de la population aux pesticides sont plutôt bien documentées pour un certain nombre de résidus de pesticides, comme en témoignent les nombreuses études réalisées et en particulier les études de l'alimentation totale (ANSES 2011). En revanche, les expositions environnementales *via* les autres compartiments sont moins bien appréhendées (ANSES and ORP 2010) alors que les contaminations sont bien réelles (Duyzer 2003). La quantification de molécules mères et de leurs métabolites dans les fluides ou les tissus biologiques a confirmé la contamination multiple. Par exemple, l'enquête nationale américaine NHANES (*National Health and Nutrition Examination Survey*), mise en œuvre pour évaluer la santé et le statut nutritionnel des américains, et incluant des mesures biologiques, a montré la présence de niveau détectable d'un grand nombre de substances chimiques ou de leurs métabolites, incluant des pesticides (phénylphénol, acide

2,4-dichlorophénoxyacétique, dieldrine, heptachlore, chlorophénols, métabolites alkylphosphates des organophosphorés), dans le sang ou les urines de la population (Center for Disease Control and Prevention 2013). De même, le volet environnemental de l'enquête nationale nutrition santé de l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) a montré que la population française était exposée à de nombreux pesticides différents dont l'hexachlorobenzène (HCB), l'isomère bêta de l'hexachlorocyclohexane (β-HCH), le DDT et le DDE, des chlorophénols, ainsi que les métabolites des organophosphorés et des pyréthrinoïdes (Fréry *et al.* 2013).

De plus, un certain nombre d'études ont observés des corrélations positives entre le fait de vivre à proximité d'activités agricoles ou dans des régions rurales, et l'exposition des individus aux pesticides : la distance au champ a été inversement corrélée au niveau de pesticides mesurés dans les poussières des maisons et/ou dans les urines (métabolites des organophosphorés) (Loewenherz *et al.* 1997; Lu *et al.* 2000). Cela a été confirmé par certains auteurs qui ont montré une corrélation entre les concentrations de chlorpyrifos, diméthylchlorthal, iprodione, phosmet et simazine dans les poussières de 89 maisons et la proximité d'activités agricoles (dans un rayon de 1250 m) (Gunier *et al.* 2011). D'autres ont étudié les déterminants des expositions aux organophosphorés chez 400 enfants californiens et ont montré que les concentrations urinaires de dialkylphosphates étaient plus élevées chez les enfants âgés de 12 mois vivant dans un rayon de 60 m autour de cultures agricoles (Bradman *et al.* 2011). Enfin, plus récemment, Chevrier *et al.* (2014) ont montré une corrélation positive entre la présence de culture de maïs dans un rayon de 350 m autour de la résidence de 579 femmes bretonnes et les concentrations urinaires en métolachlore, acétochlore et métabolites d'atrazine (herbicides du maïs) (Chevrier *et al.* 2014). Vivre en milieu rural ou à proximité d'une ferme a également été considéré comme un facteur de risque de l'exposition aux pesticides chez 190 enfants chiliens (Munoz-Quezada *et al.* 2012).

De plus, la littérature s'accorde sur l'utilité de l'association de la cartographie et des systèmes d'information géographique pour évaluer les expositions environnementales aux pesticides, sans remettre en cause la nécessité d'y associer, autant que faire se peut, une approche plus directe comme la mesure biologique (Green *et al.* 2002).

1.4. Effets sanitaires des pesticides en population humaine

Les effets sanitaires des pesticides chez l'Homme sont à ce jour bien documentés dans des conditions d'exposition élevées, notamment chez les travailleurs exposés, pour qui la présomption d'une association entre l'exposition et le lymphome non Hodgkinien, le myélome multiple, le cancer de la prostate, la leucémie, la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, les troubles cognitifs et l'altération de la fertilité est considérée comme forte ou moyenne (INSERM, 2013). La description de ces effets ne fera donc pas l'objet de ce manuscrit.

En revanche, les résultats des études investigant les effets liés à des expositions environnementales, expositions souvent complexes et à faibles doses, sont encore controversés, en particulier lorsqu'il s'agit d'étudier les effets développementaux d'expositions pré- ou péri-natales (Burns *et al.* 2013 ; Shafer *et al.* 2005). Pourtant, les périodes précoces de la vie peuvent être considérées comme particulièrement vulnérables face aux expositions aux agents chimiques.

1.4.1. La vulnérabilité fœtale

Le développement intra-utérin est un processus extrêmement complexe pendant lequel l'embryon puis le fœtus peuvent être particulièrement vulnérables aux facteurs environnementaux, et plus spécifiquement à partir de la fin de la troisième semaine du développement, lorsque la circulation extra-embryonnaire débute, et donc que les échanges avec le sang maternel se mettent en place. La 4ème semaine de développement signe le début de l'organogenèse caractérisée par de nombreuses migrations cellulaires et un processus morphogénétique régi par des mécanismes moléculaires extrêmement précis. Cette période est donc considérée comme critique pour les malformations. Jusqu'à la 8ème semaine, la mise en place des tissus fondamentaux entraîne des modifications morphologiques complexes : formation du tube neural, des structures uro-génitales primitives et de tous les autres organes primitifs. Entre la 8ème et la 11ème semaine (3ème mois), les structures uro-génitales primitives évoluent selon les sexes pour former l'appareil génital. Cette fenêtre de développement est particulièrement sensible à l'influence hormonale (différenciation sexuelle). Le développement et la différenciation de la plupart des organes et tissus sont aboutis à la fin du 4ème mois (formation des voies aériennes,

différenciation des neurones et des cellules de la glie dans la paroi du tube neural). Les prolongements axonaux des neurones se développent seulement à partir de la 17ème semaine. Quant à l'appareil respiratoire, les premières alvéoles pulmonaires ne seront formées qu'à la 24ème semaine avec la sécrétion du surfactant. La période qui suit (après le 6ème mois), jusqu'à l'accouchement, est surtout marquée par la croissance du fœtus[5].

De nombreux systèmes tissulaires et enzymatiques poursuivent leur croissance et leur maturation pendant la période post-natale lors du développement de l'enfant. Ainsi, par exemple, au niveau du système respiratoire, les sacs alvéolaires continuent de se développer jusqu'à environ 7 ans (Dilly 1984). Au niveau du système nerveux, la différenciation neuronale se poursuit jusqu'à 2 ans environ, âge auquel le cerveau a pratiquement atteint le poids de celui de l'adulte (Casey *et al.* 2000). La formation des gaines de myéline et des synapses est maximale de 0 à 3 ans, puis la densité synaptique diminue au cours du temps selon des phénomènes apoptotiques jusqu'à l'âge adulte (remodelage du cortex cérébral au cours de la vie). Au niveau du système reproducteur, si l'appareil génital est complet dès la naissance, chez le garçon ce n'est qu'à partir de la puberté que les spermatogonies se différencieront en spermatozoïdes sous l'influence de la testostérone de nouveau secrétée par les cellules de Leydig. Une altération des cellules souches à tout moment de l'enfance peut donc conduire à une altération de la production des spermatozoïdes qui ne sera visible qu'après la puberté (Griswold 1998).

Pendant cette période de vulnérabilité accrue, l'exposition de la mère, puis de l'enfant, à de faibles doses de substances toxiques pourrait être responsable d'effets sanitaires à long terme (Grandjean *et al.* 2008). De fortes présomptions pèsent déjà, depuis plusieurs décennies, sur les substances capables de moduler la synthèse ou l'activité des hormones sexuelles pendant les périodes précoces de la vie (perturbateurs endocriniens agissant sur les récepteurs aux œstrogènes, aux androgènes, ou sur la synthèse des hormones stéroïdiennes), et qui, selon certains auteurs, pourraient être responsables des modifications des fonctions de reproduction de l'homme observées dans les pays industrialisés : diminution de la qualité du sperme, augmentation de l'incidence de certains cancers

[5] Les informations sur le développement intra-utérin sont principalement issues des cours en ligne de la faculté de médecine Paris Descartes, Hôpital Cochin (Didier Rabineau, Jean-Michel Dupont, Philippe Plateaux) : Embryologie Humaine, disponible à l'adresse suivante : http://cvirtuel.cochin.univ-paris5.fr/Embryologie/Accueil/Accueil.htm, consultation du site en 2012.

hormono-dépendants ou des malformations de l'appareil génital (Irvine 2001 ; Skakkebaek *et al.* 2006). De nombreuses études suggèrent également un rôle des contaminants chimiques dans l'altération des fonctions thyroïdiennes et un lien avec le développement neurologique de l'enfant (Miller *et al*. 2009). D'autres types de substances, pouvant avoir des effets sur les systèmes nerveux, immunitaire ou reproducteur, sans modification de la fonction endocrinienne, pourraient également être concernés. C'est ainsi que le concept de l'origine fœtale des pathologies (DOHaD*, developmental origins of human adult diseases*) apporte aujourd'hui de nouveaux éclairages sur l'origine des maladies chroniques actuelles. Ce concept repose sur le principe que les évènements périnataux sont « mémorisés » par l'organisme en développement et que le phénotype des cellules évolue en fonction de ces évènements au travers de l'expression génique et de la régulation épigénétique (Barker *et al.* 1989). Ce concept est né à partir des observations épidémiologiques réalisées chez la descendance des femmes enceintes ayant connu la famine lors de l'hiver 1945 aux Pays-Bas pendant l'occupation allemande. L'altération de la croissance fœtale et la petite taille à la naissance dues à la malnutrition de la mère ont été associées à une augmentation du risque de développer des pathologies cardiovasculaires, métaboliques ou osseuses à l'âge adulte (infarctus, hypertension, diabète de type 2, ostéoporose) (Osmond and Barker 2000).

Ainsi, les phases de développement d'un organisme (périodes embryonnaire, fœtale et post-natale) peuvent être considérées comme des périodes de vulnérabilité accrue. De nombreuses hypothèses ont été formulées et étudiées ces dernières années sur l'impact des expositions environnementales de la femme enceinte aux pesticides sur le développement intra-utérin et post-natal.

1.4.2. Les effets des pesticides lors d'expositions périnatales

L'analyse des publications relatives aux études des effets sanitaires liés aux expositions environnementales aux pesticides (pendant la grossesse et/ou la petite enfance) montre que ces expositions pourraient être responsables d'un certain nombre d'effets sur les issues de grossesse (fausse-couches, malformations congénitales, restriction de croissance intra-utérine, petit poids de naissance, petit périmètre crânien) mais aussi sur le développement cognitif ou moteur de l'enfant et son comportement à plus long terme. L'analyse récente publiée par l'INSERM montre que c'est surtout pour certaines familles de pesticides que la présomption d'effets est la plus forte, et en particulier pour les organochlorés,

organophosphorés, carbamates, et triazines, les plus étudiés (INSERM, 2013). Compte-tenu de la publication récente des travaux de l'INSERM, l'objet de ce chapitre est de synthétiser les principales conclusions que l'INSERM a porté sur ces études, et de mettre à jour les données au regard de la littérature parue depuis.

Retard de croissance fœtale

Plus d'une vingtaine d'études épidémiologiques ont été conduites pour évaluer les effets d'expositions environnementales aux pesticides sur la croissance fœtale. Les pesticides les plus étudiés font partie des familles des organophosphorés, organochlorés et triazines. Les types d'études mis en œuvre sont variés et dépendent à la fois de la mesure de l'effet (mesure du poids de naissance seul comme indicateur d'un faible poids pour l'âge gestationnel (SGA) ou comme indicateur d'une restriction de croissance intra-utérine (RCIU)) et de l'estimation des expositions aux pesticides : mesures biologiques de familles chimiques de pesticides dans les urines ou le sang pour les organophosphorés et l'atrazine (Chevrier *et al.* 2011 ; Harley *et al.* 2011 ; Rauch *et al.* 2012 ; Wang *et al.* 2012 ; Whyatt *et al.* 2004 ; Whyatt *et al.* 2005), mesure biologique sanguine pour les organochlorés (Kezios *et al.* 2013 ; Pathak *et al.* 2011 ; Sharma *et al.* 2012), ou mesure indirecte de l'exposition estimée à partir de systèmes d'information géographique tenant compte de la vente de pesticides, de la proximité des cultures agricoles ou de la contamination des réseaux de distribution d'eau potable (Boccolini *et al.* 2013 ; de Siqueira *et al.* 2010 ; Grether *et al.* 1987 ; Hochoa-Acuna *et al.* 2009 ; Levario-Carrillo *et al.* 2004 ; Petit *et al.* 2010 ; Thomas et al. 1992 ; Willis *et al.* 1993 ; Xiang *et al.* 2000). Ces études suggèrent un effet de l'exposition aux organophosphorés sur la croissance fœtale, en particulier lorsque la mère présente une susceptibilité génétique sur le gène codant pour l'activité d'une enzyme responsable du métabolisme des organophosphorés (la paraoxonase 1). Une étude récente apporte une information contradictoire avec l'observation d'une association positive entre le poids de naissance (centiles) et les concentrations de diméthylphosphates dans le liquide amniotique de 415 femmes en Grèce (Koutroulakis *et al.* 2014). Cette association n'est pas retrouvée avec les diéthylphosphates, et les auteurs ne disposaient pas d'information sur les susceptibilités génétiques liées à la paraoxonase 1. La modification du poids de naissance et la prématurité en lien avec l'exposition à certains herbicides (triazines) ont également été

observées et sont résumées dans une revue récente de Ferguson et ses collaborateurs (Ferguson *et al.* 2013).

Anomalies congénitales

Une revue de la littérature récente suggère que l'exposition aux pesticides, estimée à partir de la proximité de zones agricoles, peut entrainer une augmentation du risque de malformations congénitales (Shirangi *et al.* 2011). De même, des études ciblant les expositions domestiques aux pesticides pendant la grossesse ont mis en évidence une augmentation du risque de malformations cardiaques (Loffredo *et al.* 2001 ; Shaw *et al.* 1999), du tube neural (Brender *et al.* 2010 ; Shaw *et al.* 1999), ou de l'appareil génital du petit garçon (hypospadias) (Dugas *et al.* 2010). En revanche, la plupart de ces études souffrent de limites relatives à la caractérisation de l'exposition, estimée à partir de questionnaires sur l'usage de pesticides à la maison. Ainsi l'INSERM concluait en 2013 sur la difficulté d'évaluer ce type d'effets lors d'expositions complexes aux pesticides. Les études réalisées à partir de l'exposition à des molécules spécifiques suggèrent cependant un lien entre l'augmentation du risque de malformations de la paroi abdominale et la contamination de l'eau de distribution par les triazines (Mattix *et al.* 2007 ; Waller *et al.* 2010). Ces malformations ont également été associées à l'exposition maternelle à l'atrazine, mais seulement chez les femmes de plus de 25 ans (Agopian *et al.* 2013a). De plus, d'autres malformations ont été récemment mises en lien avec l'exposition à l'atrazine, estimée à partir des enquêtes d'usages au Texas : malformations génitales du petit garçon (hypospadias, cryptorchidie et petit pénis) (Agopian *et al.* 2013b) et malformations nasales (responsables d'une sténose) (Agopian *et al.* 2013c). Pour les organophosphorés, les études disponibles ne seraient pas en faveur de l'existence d'un lien entre l'exposition et les malformations congénitales (INSERM, 2013). Deux études récentes ont examiné les associations entre la proximité de la résidence de la femme enceinte à l'application des pesticides (dans un rayon de 500 m) et les malformations congénitales. Parmi presque 300 molécules différentes, des Odds Ratio (OR) significatifs ont été mis en évidence pour les herbicides de type phénoxy, chloroacétanilide, dinitroaniline, et certains insecticides (aldicarbe, diméthoate, phorate, acéphate) avec la présence d'un hypospadias (Carmichael *et al.* 2013). De même, des OR significatifs ont été observés avec certaines anomalies neurologiques ou faciales (fentes labiales associées à l'usage de trifluraline, maneb, et

d'herbicides benzonitriles, dinitroanilines et dithiocarbamates ; spina bifida associé à l'usage d'herbicides benzonitriles, dinitroanilines, dithiocarbamates, et octanoate de bromoxynil ; anencéphalie associée à l'usage d'herbicide 2,4-D et insecticides méthomyl et imidaclopride) (Yang *et al.* 2014).

Altération du développement neurologique

L'impact de l'exposition prénatale aux organophosphorés sur le développement neurologique des enfants durant les premières années de vie a été largement étudié ces dernières années et a fait l'objet de plusieurs revues de la littérature (Burns *et al.* 2013 ; González-Alzaga *et al.* 2013 ; London *et al.* 2012 ; Munoz-Quezada *et al.* 2013 ; Polanska *et al.* 2013). Les études qui ont utilisé la mesure biologique de l'exposition ont montré un impact négatif des organophosphorés (dialkylphosphates urinaires) sur le QI (Bouchard *et al.* 2011), le développement cognitif (principalement chez l'enfant à 7 ans), le comportement des enfants en bas âge (déficit d'attention, hyperactivité) (Marks *et al.* 2010), la mémoire, l'acuité visuelle, et la motricité fine (réflexes anormaux chez les nourrissons) (Ostrea, Jr. *et al.* 2012 ; Rauh *et al.* 2011 ; Rauh *et al.* 2006 ; Zhang *et al.* 2014). Comme pour les effets sur la croissance fœtale, les enfants nés de mères ayant une plus faible activité de la paraoxonase 1 seraient plus sensibles (Eskenazi *et al.* 2010). Plus récemment, le développement neurologique et mental des enfants à un an a été corrélé de manière négative à l'exposition maternelle aux pyréthrinoïdes (mesure des métabolites urinaires) (Xue *et al.* 2013). De même, une altération de l'acuité visuelle a été mise en lien avec l'exposition pré- et postnatale au métabolite du DDT (dichlorodiphényldichloroéthylène, DDE) chez des enfants Inuits (Cartier *et al.* 2014).

Pathologies métaboliques (croissance, obésité, syndrome métabolique)

Il existe à ce jour moins d'études épidémiologiques ayant évalué les effets de l'exposition aux pesticides sur le métabolisme. Ce sont d'ailleurs essentiellement les pesticides organiques persistants qui ont été étudiés, et spécifiquement le métabolite du DDT (dichlorodiphényldichloroéthylène, DDE), l'hexachlorobenzène (HCB), la dieldrine et le bêta-HCH (Lee *et al.* 2014). Les résultats sont difficiles à interpréter car l'association entre l'exposition prénatale à ces pesticides et la croissance de l'enfant (mesure des paramètres poids et taille) n'est pas toujours retrouvée. Néanmoins, l'INSERM concluait à de fortes

présomptions restant à préciser (INSERM, 2013). Les données publiées depuis n'ont pas permis de confirmer l'association entre obésité et exposition au DDE (Warner *et al.* 2013).

Les hypothèses sur un éventuel lien entre l'exposition prénatale aux pesticides et le diabète ont été principalement formulées sur la base de données montrant le caractère prédictif des profils de croissance pendant l'enfance pour ce type de pathologie. Aucune étude épidémiologique n'a cependant directement suggéré une association entre l'exposition prénatale aux pesticides et le diabète de type 2. En revanche, la recherche dans ce domaine doit être poursuivie, notamment en raison de certaines hypothèses toxicologiques suggérant un impact de l'exposition aux pesticides sur le développement de l'obésité *via* un mécanisme de dysfonctionnement mitochondrial, comme cela est décrit dans le chapitre 1.4.3. (Lee 2011 ; Lim *et al.* 2009). D'ailleurs, Slotkin montrait en 2011 que l'exposition aux organophosphorés (chlorpyrifos, diazinon, parathion) pendant des périodes critiques du développement conduisait à une perturbation des voies de signalisation de l'AMP cyclique et à une réponse exacerbée aux stimuli gluconéogènes, faisant penser à un état de pré-diabète (Slotkin, 2011).

1.4.3. L'apport de la toxicologie dans l'étude des mécanismes d'action

Si la toxicologie ne peut pas toujours répondre à la question du risque sanitaire chez l'Homme (difficulté de mise en œuvre de protocoles expérimentaux représentatifs des expositions humaines, en termes de voie, de durée, et surtout de composition des mélanges), elle reste un outil intéressant dans l'apport de connaissances sur les mécanismes d'action toxiques des substances. Ces connaissances sont essentielles à l'étude de la plausibilité biologique en épidémiologie et peuvent en particulier apporter des éléments de réponse sur les expositions environnementales durant les phases précoces du développement d'un organisme. De récentes revues de la littérature décrivent les mécanismes toxiques à l'origine des effets sanitaires mis en évidence chez l'Homme (Mostafalou and Abdollahi 2013 ; Shelton *et al.* 2012). Les mécanismes d'action les plus étudiés sont brièvement décrits ci-après et concernent : la génotoxicité, les mécanismes épigénétiques[6], le dysfonctionnement mitochondrial, le stress oxydant, et la perturbation endocrinienne.

[6] Modifications transmissibles de l'expression des gènes ne s'accompagnant pas de changement dans la séquence d'ADN.

Génotoxicité

De nombreux pesticides sont capables d'induire des dommages à l'ADN (cassures simple et double brins, aberrations chromosomiques, adduits à l'ADN), parmi lesquels un certain nombre d'organophosphorés, de pyréthrinoïdes ou d'organochlorés (Mostafalou and Abdollahi 2013). Il a récemment été montré que des tests de génotoxicité peuvent répondre positivement à de faibles doses de pesticides représentant un mélange caractéristique des expositions alimentaires françaises (procymidone, iprodione, cyprodinil, fludioxonil et lambda-cyhalothrine) (Graillot *et al.* 2012). Les données récentes confirment le caractère génotoxique de 2 organophosphorés (acéphate et profénofos) sur un modèle expérimental de moustique (Culex quinquefasciatus) (Bhinder and Chaudhry, 2014).

Mécanismes épigénétiques

Différents types de pesticides ont été étudiés en vue de mettre en évidence des mécanismes épigénétiques. Par exemple, l'exposition de rates gestantes à la vinchlozoline induit une méthylation de l'ADN dans le sperme des rats de la 3ème génération (Guerrero-Bosagna *et al.* 2010). De même, l'exposition *in utero* et post-natale de rats au métoxychlore (Zama and Uzumcu 2009) entraîne une hyperméthylation de l'ADN au niveau des ovaires des femelles adultes. Un autre mécanisme épigénétique associé aux histones (augmentation de l'acétylation) a été observé avec la dieldrine lors d'exposition de cellules neuronales dopaminergiques (Song *et al.* 2010).

Dysfonctionnement mitochondrial

La mitochondrie est la principale source d'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) *via* le cycle de Krebs, et de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) par la fuite d'électrons provenant de la chaîne respiratoire. Elle a un rôle important dans le maintien de l'homéostasie calcique, les voies de signalisation et l'induction de l'apoptose. Un certain nombre de pesticides ont la capacité d'altérer le fonctionnement normal de la mitochondrie. Les organophosphorés pourraient conduire à des modifications dans l'activité des enzymes impliquées dans le cycle de Krebs ou le catabolisme de l'ATP (Karami-Mohajeri and Abdollahi 2013), à l'inhibition des complexes protéiques impliqués dans la chaîne respiratoire (cas du chlorpyrifos, des benzimidazoles ou du malathion) (Lee *et al.* 2012 ; Mostafalou and

Abdollahi 2013), à l'altération du système antioxydant ou à l'altération d'enzymes impliquées dans l'apoptose (Karami-Mohajeri and Abdollahi 2013 ; Shelton *et al.* 2012). De plus, certains pyréthrinoïdes et organochlorés seraient capables de modifier les voies de signalisation calcique, conduisant à des conséquences directes sur la mitochondrie et la production de ROS (Shelton *et al.* 2012). Certains pesticides ont aussi la capacité d'induire directement un stress oxydant comme cela a été montré pour le fipronil, le chlorpyrifos (Shelton *et al.* 2012), le diquat, le paraquat, le maneb, la roténone ou la dieldrine (Franco *et al.* 2010).

Perturbation endocrinienne

Les conséquences d'expositions aux pesticides sur le fonctionnement des hormones et la régulation hormonale ont été largement décrites. Un certain nombre de pesticides, de familles chimiques différentes, sont suspectés d'être des perturbateurs endocriniens, agissant sur les hormones sexuelles (œstrogène, androgènes) (Mnif *et al.* 2011) mais également sur les hormones thyroïdiennes (McKinley *et al.* 2008 ; Lacasana *et al.* 2010 ; Shelton *et al.* 2012), ou plus récemment les hormones du métabolisme (principalement pour les organochlorés et les organophosphorés) (Mostafalou *et al.* 2012). D'ailleurs, le rôle des mitochondries dans la physiopathologie du diabète a été étudié et montre que l'inhibition des complexes protéiques de la chaîne respiratoire conduit à une diminution de la consommation d'oxygène et de la demande en énergie pouvant entraîner une altération de la cascade de signalisation de l'insuline, favorisant l'insulino-résistance et le développement de l'obésité (Lee 2011 ; Lim *et al.* 2009). Parallèlement, les auteurs ont observé que l'exposition à l'atrazine et aux organochlorés pouvait réduire la capacité mitochondriale de bêta-oxydation des acides gras, ayant pour conséquence une accumulation de graisse intracellulaire qui peut également favoriser l'obésité. De même, pour les organophosphorés, un stress oxydant entrainerait la production de cytokines de l'inflammation, une altération du métabolisme du glucose accompagnée d'une altération de la cascade de signalisation de l'insuline, une péroxydation lipidique et une diminution de l'activité des enzymes anti-oxydantes (Mostafalou *et al.* 2012).

On peut noter que ces différents mécanismes d'action peuvent être liés entre eux. Ainsi, les liens entre une perturbation endocrinienne et la méthylation de l'ADN ont été largement évoqués en particulier pour les xeno-oestrogènes (Wong and Walker 2013) et observés pour

le métoxychlore (Zama and Uzumcu 2009). De même, le stress oxydant mis en évidence au niveau cellulaire peut être une cause ou une conséquence du dysfonctionnement mitochondrial, qui lui-même peut altérer la signalisation hormonale au niveau du métabolisme (Mostafalou and Abdollahi 2013). Un lien est également établi entre la production de ROS et l'oxydation de l'ADN, provoquant des cassures de brins. Ce lien a été directement observé lors de l'exposition de lymphocytes de rats *in vitro* à des organophosphorés (méthylparathion, chlorpyrifos et malathion), confirmant le caractère génotoxique de ces molécules (Ojha and Srivastava 2014). Notons enfin que les hormones thyroïdiennes influencent fortement le métabolisme énergétique, en particulier par une action directe sur la mitochondrie (augmentation de l'activité des enzymes et des constituants de la chaine de transport d'électrons) (Soboll, 1933 ; Goglia *et al.* 1999). La fonction thyroïdienne a donc un rôle fondamental dans la régulation du métabolisme des lipides et du glucose. D'ailleurs le dysfonctionnement thyroïdien a été mis en lien dans plusieurs pathologies métaboliques comme le diabète de type 2 (Lambadiari *et al.* 2011) ou l'obésité (Longhi and Radetti, 2013).

Ces données mécanistiques ont permis de poser un certain nombre d'hypothèses pour faire le lien entre les expositions environnementales aux pesticides pendant des périodes précoces de la vie et les conséquences sanitaires néfastes observées à plus long terme et en particulier les troubles neuro-développementaux (altération de la différenciation des cellules cérébrales et du développement et de la plasticité des synapses et effets comportementaux (Slotkin 2004)) et métaboliques (altération du métabolisme mitochondrial, phénomènes de résistance à l'insuline et risque d'obésité (Mostafalou *et al.* 2012)). L'analyse plus globale des modifications métaboliques en lien avec les expositions aux pesticides pourrait donc apporter une réponse complémentaire dans la compréhension des effets induits par les expositions environnementales aux pesticides.

2. La métabolomique

2.1. Définitions : métabonomique, métabolomique et métabolome

Bien que l'étude de la composition métabolique des fluides biologiques et du lien avec les altérations tissulaires existe depuis le début des années 80 (Nicholson *et al.* 1983 ; Nicholson *et al.* 1985), le terme « metabonomics » n'a été proposé qu'en 1999, et défini par J.K. Nicholson comme « la mesure quantitative de la réponse métabolique dynamique d'un organisme vivant à un stimulus physiologique, pathologique, ou à une modification génétique » (Nicholson *et al.* 1999). La réponse dynamique est reflétée au niveau cellulaire par une empreinte métabolique (signature biologique ou « métabolome ») qui correspond à la nature et la quantité des métabolites présents. Est également apparu pendant la même période le terme « metabolomics », qui consiste en l'étude de la nature et de la quantité de tous les métabolites mesurables produit par un organisme (sans notion ici de réponse dynamique) (Fiehn 2002). Le seul terme « métabolomique » sera utilisé par la suite en particulier dans la définition des approches.

La métabolomique est une technique d'exploration biologique qui identifie et quantifie les différents métabolites intermédiaires et ultimes présents dans les fluides biologiques ou dans les tissus d'un organisme. On entend par « métabolites » les produits ou intermédiaires issus du métabolisme cellulaire de l'organisme, qui participent à la croissance, à l'homéostasie et au maintien des fonctions de l'organisme (métabolites endogènes), les molécules dégradées par l'organisme mais provenant de l'environnement extérieur (métabolites des xénobiotiques ou exogènes), ainsi que les produits issus des relations symbiotiques (métabolisme de la flore bactérienne du tube digestif) (Horgan *et al.* 2009), généralement caractérisées par un faible poids moléculaire. Ces métabolites sont des oligopeptides, des acides aminés, des sucres, des acides gras simples, des acides biliaires, organiques, des vitamines, des polyphénols, des alcaloïdes, des minéraux ou tout autre molécule qui peut être ingérée, utilisée ou synthétisée par une cellule ou un organisme donné.

La métabolomique est donc une prise d'empreinte (un spectre par exemple) rapide (haut débit). Cette empreinte est la dernière étape dans la réponse moléculaire à un stimulus. Elle apporte ainsi des éléments d'information complémentaires sur la réponse de l'organisme par rapport aux autres techniques haut-débit que sont la génomique, la transcriptomique ou la protéomique. Son étude est donc pour cela très prometteuse.

Elle consiste, à partir d'un échantillon biologique (urine, sang, tissu), en :

- l'identification / la quantification de l'empreinte métabolique d'une population cellulaire, c'est-à-dire de son métabolome, afin d'améliorer les connaissances sur le lien entre gènes et phénotype, ce qui a un intérêt direct pour la recherche de biomarqueurs prédictifs de pathologies (Beckonert *et al.* 2007) ;
- l'identification / la quantification de métabolites discriminants dans des populations exposées de manière contrastée, afin d'investiguer le lien entre des expositions et la réponse biologique de l'organisme à un niveau subtoxique. Il s'agit de l'analyse des perturbations biochimiques causées par l'environnement extérieur (style de vie, alimentation, contaminants…) (Clarke and Haselden 2008) ;
- l'identification / la quantification de métabolites discriminants dans des populations atteintes d'une pathologie par rapport à des individus sains, dans le but d'investiguer le mécanisme et la réponse biologique à l'origine de la pathologie (Chan *et al.* 2009 ; Courant *et al.* 2008).

Finalement, elle peut être descriptive (révélations de similarités ou de différences entre deux échantillons), explicative (caractérisation des similarités ou des différences) ou à visée diagnostique (identification de biomarqueurs).

Les empreintes métaboliques peuvent être réalisées sur tout type de liquides, de cellules ou de tissus organiques, tels que : les urines, la salive, les tissus de biopsie, les lignées de cellules placentaires, le sperme (Beckonert *et al.* 2007 ; Bollard *et al.* 2005 ; Heazell *et al.* 2008 ; Hung *et al.* 2009 ; Lin *et al.* 2009). Les plus couramment utilisés sont les urines et le sang (plasma ou sérum)[7], car il s'agit de prélèvements pas ou peu invasifs par rapport à d'autres, et qui sont très appréciés en particulier pour les études toxicologiques et cliniques

[7] Le plasma est la partie liquide du sang non coagulé. Il est obtenu après centrifugation du sang total auquel on a ajouté un anti-coagulant. Le sérum est obtenu après centrifugation du coagulum obtenu en quelques minutes lors de la coagulation naturelle du sang total. Sa composition est différente de celle du plasma car il a subi des modifications liées à la coagulation (par exemple il ne contient plus de fibrinogène).

(collecte d'urine ou prise de sang). Des éléments sont donc aujourd'hui disponibles dans la littérature concernant les profils métaboliques d'urine ou de sang chez l'Homme ou l'animal de laboratoire, en particulier concernant la variabilité des empreintes et l'étude d'influences génétiques, physiologiques ou liées au mode de vie (Gavaghan *et al.* 2000 ; Lenz *et al.* 2003 ; Bollard *et al.* 2005 ; Wang *et al.* 2006).

2.2. L'analyse métabolomique : une approche chimiométrique

La métabolomique associe l'utilisation des techniques de spectroscopie à des outils statistiques pour l'identification de métabolites significativement modifiés entre des groupes d'individus.

On distingue la métabolomique non ciblée, qui est la technologie haut-débit correspondant à une analyse globale de toutes les molécules présentes dans un échantillon (à des concentrations mesurables), incluant des molécules inconnues à l'heure actuelle, et la métabolomique ciblée, qui permet la mesure de groupes de métabolites spécifiques, caractérisés et appartenant à une même voie métabolique (comme les lipides, les acides aminés ou les stéroïdes). L'identification de nombreux métabolites nécessite l'utilisation de stratégies complexes d'analyse statistique des données pour tenir compte des différents cofacteurs d'influence (Chen *et al.* 2006 ; Clarke and Haselden 2008). On nomme chimiométrie l'association des techniques d'acquisition spectrale et des techniques statistiques employées.

L'obtention d'un profil métabolique équivaut à l'obtention d'un spectre qui peut être acquis grâce à l'aide de diverses techniques analytiques de spectroscopie. Aujourd'hui, la résonnance magnétique nucléaire (RMN) et la spectrométrie de masse (SM) sont les techniques les plus utilisées. Le principal avantage de la RMN est la simplicité de préparation de l'échantillon, l'adaptabilité de la méthode à des techniques haut-débit et la capacité à offrir une empreinte métabolique quantitative. Elle a été largement privilégiée pour les études à large échelle, lorsque l'objectif était d'identifier des métabolites discriminants entre différents groupes de population. La principale limite de la RMN est sa faible sensibilité comparée à d'autres techniques analytiques conduisant à des limites de détection plus élevées. Si ce n'est pas un inconvénient pour la détection de métabolites endogènes, dont

les quantités sont globalement importantes par rapport aux limites de quantification actuelles (quelques millimolaires versus un micromolaire), cela le devient pour la détection de xénobiotiques à l'état de traces, ou de composés endogènes faiblement concentrés comme les hormones. Ainsi la SM devient une technique de choix depuis le développement de la SM haute résolution (HRMS). Couplée à des techniques de séparation comme la chromatographie liquide ou gazeuse et l'électrophorèse capillaire, la SM permet de gagner en précision (Breitling *et al.* 2006), en détectant des molécules non observables avec la technique de RMN. Ces développements sont à l'origine de la large utilisation de la SM dans la recherche de biomarqueurs et pour l'identification d'empreintes métaboliques à l'heure actuelle (Werner *et al.* 2008). Néanmoins, la SM possède également des inconvénients pour l'analyse de fluides biologiques (Combourieu 2007). En particulier, la quantification précise n'est pas applicable à un profilage complet du fait de la nécessité de disposer de standards internes. D'autres techniques moins répandues existent. Ainsi la spectroscopie optique (infra-rouge ou Raman) peut être utilisée en raison de la simplicité de préparation des échantillons. Chacune de ces techniques possèdent donc des avantages et des inconvénients repris, pour les principales (RMN et SM) dans le tableau 2.

Tableau 2 : Comparaison de la spectrométrie de masse et de la résonance magnétique nucléaire pour le profilage métabolique

	Spectrométrie de masse (SM)	Résonance magnétique nucléaire (RMN)
Objectifs	Etude des flux métaboliques dynamiques (réseaux métaboliques) = évolution temporelle sur un même individu (bonne sensibilité), caractérisation et identification de biomarqueurs	Etude à large échelle en vue de discriminer des groupes de population ; automatisation, haut débit, bonne reproductibilité (Horgan *et al.* 2009)
Préparation des échantillons	Filtration ; séparation (LC, GC) conseillée pour éliminer les effets de matrice	Dilution ; ± solution tampon
Quantités nécessaires à l'injection	10-15 µL	200 à 500 µL (plasma/ urine)
Temps d'analyse	20 - 50 min (Clarke and Haselden 2008)	10 min (Clarke and Haselden 2008), possibilité d'avoir un passeur automatique
Avantages	Analyse non ciblée, haute résolution Meilleure sensibilité (LD = 10^{-12} M)(Clarke and Haselden 2008) : permet de détecter des petits groupements comme sulfates, amines, groupes carboxyles Plus d'information sur la caractérisation des biomarqueurs	Analyse non ciblée, bonne reproductibilité (absence de dérive du signal) Analyses statistiques plus solides pour l'identification de groupes contrastés (Beckonert *et al.* 2007) Bonne précision quantitative (aire des pics directement proportionnelle à la concentration) Plus rapide que la SM (un seul passage par échantillon)
Inconvénients	Analyse restreinte par la préparation des échantillons (filtration, molécules non ionisables…) Effets de matrice qui engendre une grande variabilité du signal (dérive) Répétabilité 15-30 % Problèmes d'étalonnage interne Semi-quantitatif et moins rapide (plusieurs passages, différents modes)	Moins bonne sensibilité (10^{-5} M) (Clarke and Haselden 2008 ; Dumas *et al.* 2006) Plus adapté à l'identification de profils métaboliques entre divers groupes de population (exploitation statistique) mais moins adapté pour générer des hypothèses mécanistiques / réseaux métaboliques (données manquantes)

Sources : Canlet C., Cravédi J.P., Jourdan F., Antignac J.P. Communications personnelles, février - mars 2009.

Le choix de l'une ou de l'autre méthode est souvent dicté par un compromis entre les objectifs à atteindre (identification d'une empreinte ou de métabolites discriminants, sensibilité, reproductibilité, quantification, réseaux métaboliques) et la faisabilité technique (ressources, temps, financements).

Notons qu'une image la plus fidèle possible d'un échantillon complexe ne pourra néanmoins se faire que grâce à l'association de plusieurs techniques analytiques. Par exemple, la RMN

et la SM peuvent être utilisées de manière complémentaire pour maximiser les chances d'identifier et de quantifier le plus de métabolites possibles (Clarke and Haselden 2008). Chan *et al.* ont comparé les deux approches dans le cas du profilage métabolique de cellules cancéreuses (cancer colo-rectal) et de cellules normales (mucus colo-rectal). Leurs travaux indiquent que la RMN et la SM sont deux techniques intéressantes (car discriminantes) et complémentaires (Chan *et al.* 2009). En effet, 31 marqueurs métaboliques ont pu être mis en évidence, dont un tiers grâce à la RMN (composés contenant de la choline, lactate, taurine, lipide totaux, scyllo-inositol, glycine) et deux tiers grâce à la SM (différentes classes d'acides gras, prostaglandines, uridine, phosphate, fumarate, malate, certains acides aminés, sucres). Seuls le lactate, la glycine et le glucose ont été mis en évidence à la fois avec les deux techniques.

La présentation des empreintes spectrales extraites sous un format exploitable pour l'analyse statistique nécessite une étape de prétraitement des données, qui comprend généralement l'alignement des empreintes des différents échantillons étudiés, la réduction du bruit de fond et la normalisation des données, et en fonction des techniques analytiques utilisées, des procédures de déconvolution[8], de choix des pics d'intérêt, ou de bucketing[9]. Enfin, l'une des dernières étapes concerne la standardisation des données pour que toutes les variables aient le même poids, quelle que soit leur variance.

Dans les données spectrales, les variables utilisées ne sont pas directement les métabolites mais des signaux, qui sont largement corrélés entre eux car pouvant appartenir à la même molécule. Par exemple, en RMN du proton, un signal présent à un déplacement chimique donné correspond à la quantité de proton ayant le même environnement chimique et est proportionnel à la concentration de la molécule à laquelle appartient le (ou les) proton(s) en question. Ce signal est donc corrélé à tous les autres signaux du spectre correspondant aux autres protons de la même molécule. La figure 6 montre l'exemple du spectre RMN ^{1}H de l'acide hippurique, où les signaux à 3,97 ppm, 7,53 ppm, 7,62 ppm et 7,82 ppm

[8] « Extraction, par un procédé mathématique, d'un signal d'une matrice complexe afin d'obtenir des spectres de masse épurés » (Allibe-Signorini *et al*. 2008).
[9] Segmentation du spectre en régions consécutives non chevauchantes. Chaque région équivaut à une aire sous le signal propre.

correspondent tous à des protons de la même molécule. Ces signaux sont donc corrélés entre eux.

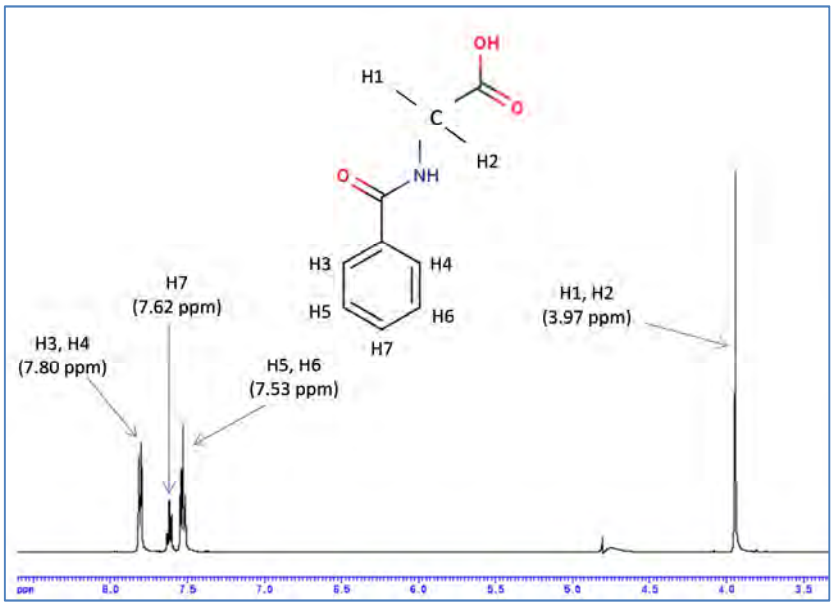


Figure 6 : Spectre RMN 1H de l'acide hippurique.

De ce fait, les techniques statistiques classiques (régression des moindres carrés ordinaires par exemple) ne peuvent pas être appliquées aux données de métabolomique, d'autant que le nombre de variables est largement supérieur au nombre d'observations. Ce sont donc des méthodes multivariées (analyse en composantes principales – ACP, régression partial least squares – PLS par exemple) qui sont plutôt utilisées (Chen *et al.* 2006 ; Clarke and Haselden 2008). La PLS est l'une des techniques les plus employée jusqu'à maintenant. Il s'agit d'une méthode multivariée de réduction de la dimensionnalité où un petit nombre de variables latentes (combinaisons linéaires des variables initiales) est calculée selon un critère d'optimisation.

L'identification des métabolites joue ensuite un rôle important dans l'interprétation des données de métabolomique. Généralement elle se fait à partir de bases de données spectrales disponibles sur internet. Une revue de l'ensemble de ces méthodes (prétraitement des données, analyses statistiques et identification des métabolites) est présentée dans le chapitre 3.

2.3. Les facteurs de variation des empreintes métaboliques chez l'homme

Le métabolome étant le reflet du fonctionnement d'un organisme, on peut s'attendre à ce qu'un certain nombre de caractéristiques individuelles liées au style de vie et à la physiologie aient des conséquences directes sur les profils métaboliques des individus. A ce jour, de nombreuses publications se sont intéressées à la variabilité des profils métaboliques chez l'Homme en fonction de ces caractéristiques individuelles. Les principaux facteurs incluent l'alimentation et le style de vie, les origines culturelles et l'ethnicité, les caractéristiques génotypiques, épigénétiques, l'âge, le sexe, ou encore l'indice de masse corporelle (IMC).

Une analyse de métabolomique sur le plasma et les urines de 160 participants a mis en évidence des profils alimentaires types et a en particulier observé une association positive entre les concentrations de O-acétylcarnitine ou de phénylacétylglutamine et les régimes alimentaires respectivement riches en viandes rouges et en légumes (O'Sullivan *et al.* 2011). La métabolomique a également été utilisée pour identifier des signatures métaboliques caractéristiques de certains styles de vie, en particulier le tabagisme (modifications des acides aminés et glycérophospholipides sériques) (Xu *et al.* 2013), la consommation d'alcool (impact sur le métabolisme lipidique) (Jaremek *et al.* 2013), ou encore l'activité physique (augmentation des concentrations sériques des acides aminés) (Floegel *et al.* 2014).

Des différences liées aux origines culturelles, probablement marquées par le régime alimentaire des individus, ont été observées sur un petit nombre de volontaires sains (n = 30) (excrétion urinaire d'hippurate, taurine et oxyde de triméthylamine (TMAO) plus élevée chez des suédois par rapport aux anglais, qui ont, eux, une excrétion plus importante de créatinine) (Lenz *et al.* 2004). Ces différences ont aussi été observées dans une étude de beaucoup plus grande ampleur ayant comparé les profils métaboliques de 4 000 individus provenant d'Asie, d'Amérique du Nord et d'Europe et mises en lien avec les facteurs de risque de pathologies cardiovasculaires (Holmes *et al.* 2008). Depuis la publication de ces travaux relatifs au phénotypage métabolique, de nombreuses études de grande ampleur ont permis de clarifier les liens entre le génome (polymorphismes), l'épigénome et le métabolome. Par exemple, Suhre *et al.* ont identifié, sur une population de plus de 2 800 européens (Grande Bretagne, Allemagne), plus d'une trentaine de loci associés à la concentration sérique de métabolites et expliquant une grande partie de la variabilité totale

dans la population étudiée. Certains de ces profils métaboliques « génétiquement déterminés » ont pu être mis en lien avec des pathologies ou des facteurs de risques (évaluation de la fonction rénale, diabète, pathologies cardiovasculaires) (Suhre *et al.* 2011). D'autres loci en lien avec le métabolisme des acides aminés, du citrate et des lipides ont ensuite été identifiés sur plus de 9 000 individus (Kettunen *et al.* 2012). L'épigénétique pouvant expliquer une grande part de la variabilité au sein de la population, Petersen *et al.* ont suggéré que la méthylation de l'ADN pouvait avoir des conséquences directes sur le métabolisme. Ils ont observé une association entre la méthylation de plusieurs sites CpG et les caractéristiques métaboliques des individus, indépendamment des caractéristiques génétiques, laissant suggérer le rôle important des facteurs environnementaux dans les modifications métaboliques (Petersen *et al.* 2014).

Concernant les facteurs physiologiques, il a été montré une modification de certains acides aminés urinaires (en particulier l'histidine, la thréonine, l'alanine, la glycine et la phénylalanine), qui présentaient une excrétion urinaire plus élevée dans l'enfance et à un âge avancé comparé au milieu de vie (20 à 50 ans) (Bertram *et al.* 2009). Valine, tyrosine, isoleucine et alanine sont également modifiées avec l'âge (comparaison d'individus de moins de 30 ans et de plus de 46 ans) (Kochhar *et al.* 2006). La carnitine, le 3-hydroxy-isovalérate, la créatinine, l'alanine et la trigonelline sont également significativement différents entre les individus de moins de 40 ans et ceux de plus de 40 ans (Slupsky *et al.* 2007). Des modifications de TMAO, citrate et hippurate ont également été liées à l'âge dans une population d'adultes (Psihogios *et al.* 2008). Chez les enfants, Gu *et al.* ont observé une augmentation de créatinine et une diminution de créatine, glycine, bétaine, TMAO, citrate, succinate et acétone dans les urines des enfants de 5 à 12 ans comparés aux nourrissions de 0 à 1 an (Gu *et al.* 2009). Il est également connu que la créatinine urinaire augmente avec l'âge jusqu'à une trentaine d'année puis diminue ensuite à un âge plus avancé (Barr *et al.* 2005).

Bertram *et al.* ont étudié l'influence de certains paramètres chez des adolescents de 17 ans et ont conclu que le sexe avait une influence importante sur le métabolome plasmatique des individus (différences significatives dans les concentrations de lipoprotéines (HDL, LDL, VLDL), glucose, choline, et certains acides aminés), mais pas le poids, la taille, ni l'IMC (Bertram *et al.* 2009). Kochhar *et al.* ont aussi observé des modifications de choline plasmatique, taurine, citrate et créatinine ou créatine urinaire en lien avec le sexe (Kochhar

et al. 2006). Ces derniers auteurs ont par ailleurs montré un effet de l'IMC sur le métabolome plasmatique : les concentrations en choline et citrate étaient plus élevées chez les individus ayant un faible IMC, alors que les concentrations en créatine/créatinine, tyrosine, isoleucine, lipides insaturés et glycoprotéines étaient plus élevées chez les individus avec un IMC élevé (Kochhar *et al.* 2006). Plus récemment, l'augmentation des concentrations en acylcarnitines et glucides sanguins et la diminution des phospholipides sanguins ont également été associées à l'obésité dans une population de plus de 2 300 individus (Floegel *et al.* 2014).

Il faut également noter que certains fluides biologiques semblent plus sujets à une importante variabilité inter- ou intra-individuelle que d'autres. Ainsi, après avoir comparé 12 hommes en bonne santé, ayant eu une alimentation standardisée durant 24 h avant les premiers prélèvements biologiques, excluant la consommation d'alcool et de tabac, avec un IMC compris entre 18 et 30, Lenz *et al.* ont observé une variabilité interindividuelle importante sur le métabolome urinaire, mais pas sur le métabolome sanguin (Lenz *et al.* 2003).

2.4. Les applications actuelles de la métabolomique

Aujourd'hui, les applications de la métabolomique sont très nombreuses. On peut citer, sans être exhaustif, les applications suivantes : en nutrition, pour connaître les qualités nutritives des aliments (Barnes 2008 ; Wishart 2008), en biologie végétale, pour étudier les phénomènes d'adaptation (Keurentjes 2009), en agronomie, notamment pour l'étude des variétés de cultivars (Beckmann *et al.* 2007) et plus récemment en sécurité alimentaire, en particulier pour l'étude des plants transgéniques (Davies 2009 ; Hoekenga 2008), en pharmacologie, pour le screening de la toxicité de nouvelles molécules (Keun and Athersuch 2007 ; Lindon *et al.* 2007), en recherche clinique dans l'identification de nouveaux biomarqueurs (Issaq and Blonder 2009 ; Kitteringham *et al.* 2009), en toxicologie (Clarke and Haselden 2008 ; Coen *et al.* 2008) et en épidémiologie (Dumas *et al.* 2006 ; Ellis *et al.* 2012 ; Holmes *et al.* 2008).

En toxicologie, les travaux utilisant la métabolomique sont de plus en plus nombreux, en particulier en matière de santé environnementale (étude des expositions à des contaminants

environnementaux plus ou moins représentatif des expositions humaines), comme en témoigne la revue bibliographique réalisée sur le sujet (chapitre 3).

3. Utilité de la métabolomique en santé environnementale

Cette revue, basée sur un état de l'art des applications actuelles de la métabolomique en santé environnementale, permet de conclure à l'intérêt de cet outil à la fois pour identifier des biomarqueurs d'exposition complexes directement sur des populations humaines, et pour suggérer des hypothèses sur les mécanismes impliqués dans la genèse des pathologies environnementales.

Elle est fondée sur l'analyse des résultats des expérimentations toxicologiques et des études épidémiologiques. Ces deux stratégies apportent des éléments complémentaires en raison de leurs avantages respectifs : expositions contrôlées chez l'animal, permettant de réduire la variabilité inter- et intra-individuelle, définition de groupes d'exposition contrastée chez l'Homme, permettant d'évaluer directement des expositions complexes à faibles doses.

L'étude des conséquences biochimiques d'expositions environnementales complexes reste un challenge qui nécessite la mise en œuvre de protocoles pertinents prenant en compte les facteurs de confusion éventuels. Ainsi, le choix des populations d'étude, les stratégies d'échantillonnage, les conditions de stockage des échantillons, et les outils statistiques utilisés méritent d'être étudiés avec attention. Cette revue, qui discute des différentes stratégies d'analyse, permet de dresser un certain nombre de suggestions en vue d'améliorer les protocoles expérimentaux et épidémiologiques en ce sens.

Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, 17:21–44, 2014
Copyright © Taylor & Francis Group, LLC
ISSN: 1093-7404 print / 1521-6950 online
DOI: 10.1080/10937404.2013.860318

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

POTENTIAL INPUT FROM METABOLOMICS FOR EXPLORING AND UNDERSTANDING THE LINKS BETWEEN ENVIRONMENT AND HEALTH

Nathalie Bonvallot[1,2,3], Marie Tremblay-Franco[3], Cecile Chevrier[1,4], Cecile Canlet[3], Laurent Debrauwer[3], Jean-Pierre Cravedi[3], Sylvaine Cordier[1,4]

[1]INSERM UMR1085 IRSET, Rennes, France
[2]EHESP Rennes, Sorbonne Paris Cité, France
[3]INRA UMR 1331 Toxalim, University of Toulouse, INP, ENVT, EIP, UPS, UMR1331, Toulouse, France
[4]University of Rennes I, Rennes, France

Downloaded by [Nathalie Bonvallot] at 01:53 10 March 2014

Humans may be exposed via their environment to multiple chemicals as a consequence of human activities and use of synthetic products. Little knowledge is routinely generated on the hazards of these chemical mixtures. The metabolomic approach is widely used to identify metabolic pathways modified by diseases, drugs, or exposures to toxicants. This review, based on the state of the art of the current applications of metabolomics in environmental health, attempts to determine whether metabolomics might constitute an original approach to the study of associations between multiple, low-dose environmental exposures in humans. Studying the biochemical consequences of complex environmental exposures is a challenge demanding the development of careful experimental and epidemiological designs, in order to take into account possible confounders associated with the high level of interindividual variability induced by different lifestyles. The choices of populations studied, sampling and storage procedures, statistical tools used, and system biology need to be considered. Suggestions for improved experimental and epidemiological designs are described. Evidence indicates that metabolomics may be a powerful tool in environmental health in the identification of both complex exposure biomarkers directly in human populations and modified metabolic pathways, in an attempt to improve understanding the underlying environmental causes of diseases. Nevertheless, the validity of biomarkers and relevancy of animal-to-human extrapolation remain key challenges that need to be properly explored.

Regulations on chemicals entering the European Union (EU) market, for both domestic and professional uses, are based on risk assessment and management, on a chemical-by-chemical basis (i.e., Regulations EC 1107/2009 on pesticides or EC 1907/2006 on chemicals). Although these methods allow for a comprehensive risk assessment for single chemicals for regulatory purposes, these techniques do not permit a global risk analysis in the case of different uses and multiple exposures. Multiple exposures involve various substances and sources as well as routes of exposure (diet, air, oral or respiratory). Regulatory toxicological tools are not suitable for the study of effects induced by the complex and low-dose mixtures that are representative of human exposures, and are of limited relevance for environmental health. In this context, development of new strategies—especially identification of biomarkers of early effect using high-throughput approaches such as metabolomics—is of particular importance. This bioanalytical approach entails studying the nature and quantity of potentially all metabolites produced by an organism, that is,

Address correspondence to Nathalie Bonvallot, EHESP School of Public Health, Avenue du Professeur Léon Bernard, CS74312, F-35043 Rennes Cedex, France. E-mail: nathalie.bonvallot@ehesp.fr

the detectable endogenous molecules involved in the growth and homeostasis of the organism. The metabolic profile constitutes the ultimate step in the cellular response, and is considered the key link between genes and phenotypes (Fiehn, 2002). Metabolomics has come to be widely used in recent years to identify metabolic pathways modified by disease, drugs or exposure to contaminants (Lindon et al., 2004; Robertson et al., 2011). As metabolomics has the ability to provide helpful information in the definition of markers of toxicity, as reported for hepatotoxicity or nephrotoxicity by Beger et al. (2010), this approach may constitute an integrative tool to enhance our understanding of the subtle metabolic disruptions induced by complex and low-dose exposures to pollutants as described in Figure 1.

Further, the metabolic changes induced by these exposures may be observed directly from biological fluids that are easy to collect, such as urine or blood, making possible their identification directly in humans. However, these changes remain difficult to identify due to the high number of potentially confounding factors affecting the metabolome, in addition to environmental exposure (lifestyle, diet, or therapeutic drug treatments). This is why the metabolomic approach in humans has not yet been extensively explored in the field of environmental health. In this context, this review attempts to determine whether metabolomics might constitute an original approach to examine associations between multiple, low-dose exposures to environmental pollutants and effects on humans. Following a description of the methods used in metabolomics, current applications in environmental health in both toxicology and epidemiology are provided to identify the most important criteria that need to be taken into account. Finally, this review addresses ways in which to identify key methodological challenges. The aim of this review was not intended to (1) be a comprehensive examination of the methods used in metabolomics (already available elsewhere), nor (2) indicate how toxicological studies may provide corroborative evidence to support the results observed in epidemiological studies.

METHODS USED IN METABOLOMICS

Metabolomics combines the use of analytical and statistical tools to identify metabolites that are significantly modified between groups as shown in the flowchart presented in Figure 2. Two types of metabolomic approaches can be distinguished: untargeted metabolomics, which corresponds to a comprehensive analysis of all measurable molecules in a sample (including unknown metabolites), and targeted metabolomics, in which a set of chemically and biochemically characterized metabolites such as lipids, amino acids, nucleotides, or steroids

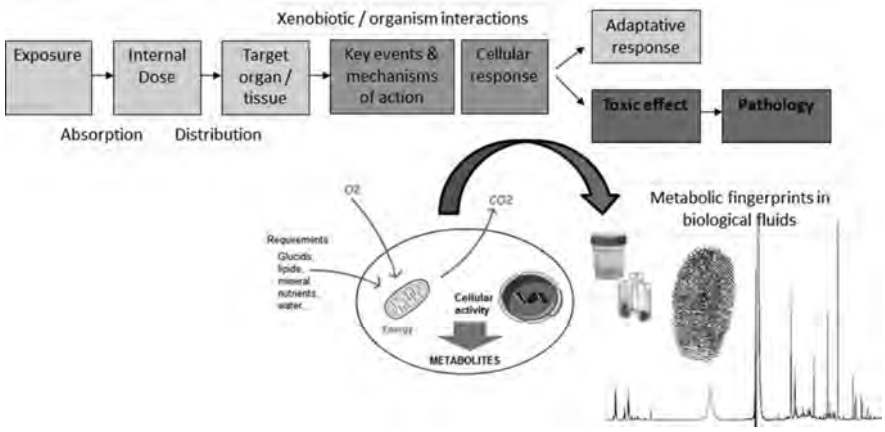


FIGURE 1. Diagram of the toxicity of a contaminant and the link with the metabolic fingerprint.

Downloaded by [Nathalie Bonvallot] at 01:53 10 March 2014

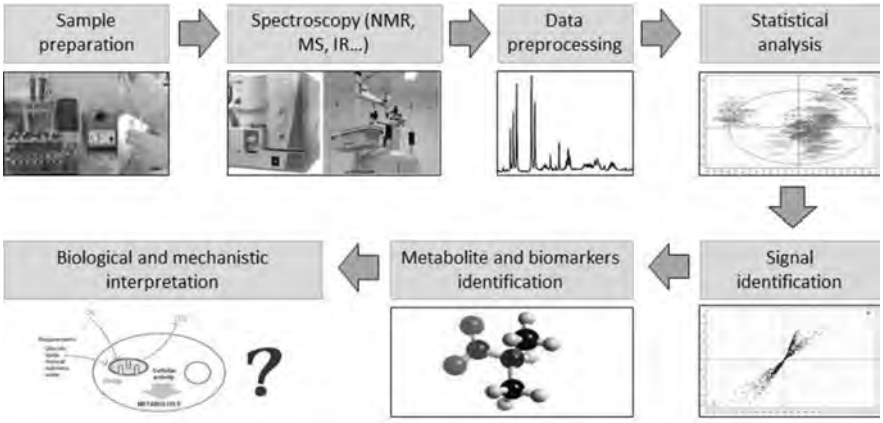


FIGURE 2. Flowchart of a metabolomics analysis.

Downloaded by [Nathalie Bonvallot] at 01:53 10 March 2014

is measured. Samples used for metabolomic studies could be any biological matrices, including fluids such as urine, plasma, saliva, sperm, animal tissue extracts, or human tissues such as biopsies or placenta. The most widely used samples are urine and plasma because these correspond to noninvasive (or minimally invasive) procedures and require limited, if any, pretreatment steps prior to analysis.

Analytical Tools

The analytical tools used in metabolomics are based upon spectroscopic techniques. Currently, due to their performance for analysis of small organic molecules and their complementary information, nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrometry (MS) are the most widely used analytical techniques in metabolomics. Mass spectrometry is mostly used in hyphenation with different chromatography techniques (gas or high-/ultra-performance liquid chromatography, respectively GC and HPLC/UPLC) or capillary electrophoresis for sample separation prior to MS analysis. These methods have been in use for more than 40 years for the characterization of cellular energy metabolism or for biofluid analyses. Sample preparation steps typically used for NMR and MS analyses were reviewed by Alvarez-Sanchez et al. (2010a). The main advantages of NMR rely on (1) ease of sample preparation, (2) nondestructive analysis of the sample which may be recovered for further analyses, (3) adaptability of the method to high-throughput analyses, and (4) ability to provide a quantitative picture of the metabolic fingerprint. This technique was therefore generally preferred for large-scale applications, where thousands of molecules were being measured within a short period of time. NMR allows for measurement of metabolites, typically at the micrograms per milliliter level, and is less sensitive than MS, which detects compounds at the picograms per milliliter level. Besides sensitivity, the broad diversity of ionization methods and mass analyzers (Bedair and Sumner, 2008) available for MS enables identification of a large number of metabolites. The development of high-resolution MS techniques particularly over the last 10 years has expanded the capacity for compound identification, attributed in particular to accurate mass measurements offering access to the elemental composition of metabolites and their potential fragments. This feature provides valuable information for identification of "known unknowns" using chemical database queries. However, unlike NMR, MS sensitivity is compound dependent and may be affected by matrix effects. In addition, absolute quantification by MS requires specific approaches based on targeted compounds, and global profiling is often limited to semiquantitative approaches. To a lesser extent, optical spectroscopy (e.g., near-infrared or Raman) is also used because of the simplicity of sample preparation. Each tool

provides complementary information regarding the wide diversity of metabolite chemical structures. Comprehensive reviews on these topics are available elsewhere (Bothwell and Griffin, 2011; Dettmer et al., 2007; Dunn et al., 2005; Lindon and Nicholson, 2008; Ross et al., 2007), and a comparison of NMR and MS techniques was recently published by Bouhifd et al. (2013).

Data Preprocessing

The objective of the data preprocessing stage is the achievement of extracted data corresponding to quantified spectral peaks by converting raw data into files easily usable for statistical analyses. This includes different steps depending upon the selected analytical tool and as described by Madsen et al. (2010). Alignment, baseline correction, peak picking, and deconvolution are several methods utilized for both MS and NMR techniques and previously described (Koek et al., 2011; Theodoridis et al., 2012). With MS, resulting data sets include retention time, m/z ratio, and intensity of each detected signal, and thus, peak identification is required. Normalization can also be used to minimize bias and experimental variability induced in the analytical step. In NMR spectroscopy, it is also possible to include a bucketing step in the case of untargeted metabolomics, where spectra are reduced into consecutive spectral bins (Ross et al., 2007). Subsequent steps include scaling when maximum variance projection methods were applied to yield the same weight to variables that may have different ranges. Most often, unit variance where datum matrix is divided by the standard deviation to obtain a variance of 1, mean centering (subtraction of the mean), or Pareto scaling (divided by the square root of the standard deviation) is used (Van den Berg et al., 2006). Molinska et al. (2012) recently described preprocessing steps. Finally, filtering might also be used to improve data quality illustrated by Bouhifd et al. (2013).

Statistical Tools

Spectral analyses encompass hundreds of variables (peaks or spectral regions) that are highly correlated. Dimension reduction is therefore one of the main objectives of statistical analyses and is performed by multivariate methods. A large number of different statistical tools are available in both unsupervised and supervised methods and were described elsewhere (Madsen et al., 2010; Putri et al., 2013). Principal component analysis (PCA), nonhierarchical or hierarchical clustering, linear discriminant analysis (LDA), partial least squares (PLS) regressions, orthogonal projections to latent structures (OPLS), and machine learning techniques such as support vector machines (SVM) are some examples. PCA and PLS are most often used to study the effects of environmental pollutants on health.

PCA is a nonsupervised method enabling visualization of spontaneous distribution of the observation in a two-dimensional plane (Bair et al., 2006); partial least squares (PLS) regressions are supervised methods that supply a statistical model explaining individual characteristics (e.g., exposures) according to the matrix of experimental variables such as metabolites (Wold et al., 2001). Different variants exist, such as PLS-DA (PLS-discriminant analysis), widely used for modeling observations belonging to different groups including case/control or differently exposed individuals (Waterman et al., 2009), or OPLS. In OPLS, Y-predictive variability of X (correlated to Y) is separated from Y-orthogonal variability (uncorrelated to Y). Predictive variability is only modeled by predictive components (Trygg and Wold, 2002). In all cases, different models that are constructed need to be validated. The most common methods are the use of an independent validation set or cross-validation (Broadhurst and Kell, 2006; Wold et al., 2001).

Metabolite Identification and Biological Interpretation

Metabolite identification plays a key role in the interpretation of the metabolomics research results. Different approaches are needed depending on the analytical tool selected but spectral library searching on the Internet is a

Downloaded by [Nathalie Bonvallot] at 01:53 10 March 2014

common step. The Madison metabolic consortium database (MMCD, http://mmcd.nmrfam.wisc.edu), the Human Metabolome Database (HMDB, http://www.hmdb.ca), the Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB, http://www.bmrb.wisc.edu/metabolomics) and the Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG, http://www.genome.jp/kegg) are widely used. Werner et al. (2008) examined databases from MS data used for metabolome annotation. More recently, Fukushima and Kusano (2013) reviewed the development of the metabolome databases, especially the HMDB, which has been expanded considerably and now includes more than 40,000 annotated metabolites (Whisart et al., 2009, 2013).

Unknown metabolites need to be identified using MS/MS or NMR structural characterization tools. When a chemical structure is suggested, confirmation can be obtained by comparison with the spectra of authentic standards. When potential metabolites from exogenous contaminants are indicated, it is also possible to carry out short experiments in lab mammals exposed to parent compounds, so as to unambiguously characterize their metabolites by plasma or urinary analysis (Jamin et al., 2013).

Two-dimensional NMR spectra are also required as an aid to spectral assignment and to confirm the identity of metabolites. Once candidate biomarkers have been identified, the final step is to decipher the main metabolic pathways involved in the modifications observed, and suggest biological hypotheses in accordance with the involvement of the modified metabolites in biochemical pathways such as amino acids synthesis, energetic metabolism, or fatty acids oxidation. In order to fully integrate these data, mechanistic interpretation needs to be achieved at the metabolic network level. Metabolic network gathers all metabolic reactions an organism performs into a single mathematical model. For humans, a compartmentalized model publicly available contains 3311 reactions and 2766 metabolites (Duarte et al., 2007). The aim is to computationally decipher, among all these reactions and metabolites, the ones involved in the metabolic response of the organism when exposed to contaminants. To accomplish this, algorithms have been developed that extract relevant subnetworks based on network topology and biomarkers (Jourdan et al., 2010).

CURRENT APPLICATIONS IN ENVIRONMENTAL HEALTH

Animal experiments and epidemiological studies are commonly used to assess potential factors that affect human health, and in particular the effect of chemical exposure as a risk factor. In this context, comparing various exposure groups in animals or humans can determine potential links between an environmental factor and a health consequence. In the field of toxicology, metabolomics is used to identify candidate biomarkers of exposure and effects. Many toxicological studies demonstrated that metabolomics is a powerful method for detecting changes in the metabolome of exposed individuals. The identification of discriminant metabolites between groups is made easier by the possibility of controlled conditions: interindividual variability among tested animals is reduced by the use of similar species, strains, individuals, and lab conditions. Most of the toxicological studies have been published within the context of drug development (Beger et al., 2010; Robertson, 2005). In recent years, investigators focused on environmental pollutants, in particular endocrine disruptors such as phthalates, plasticizers widely found in our environment, and pesticides. Table 1 describes various studies carried out on animals, methodological approaches used, and results. Sumner et al. (2009) showed correlations between developmental outcomes in rat pups exposed to benzylbutyl phthalate (BBP) during pregnancy and modification of the metabolic pathways in dams and pups. Modifications included metabolites derived from citrate cycle and amino acid catabolism. Changes were observed in urine by NMR spectroscopy and subsequent PCA and PLS-DA analyses. It was suggested that di(ethylhexyl) phthalate (DEHP) exposure might modify

Downloaded by [Nathalie Bonvallot] at 01:53 10 March 2014

Downloaded by [Nathalie Bonvallot] at 01:53 10 March 2014

TABLE 1. Description of the Toxicological Studies Investigating the Metabolic Modifications Observed After an Exposure to Environmental Pollutants, Alone or in Mixtures, With a Nontargeted Metabolomics Approach

Chemical(s)	Experimental design	Analyses	Main findings	Reference
BBP	Pregnant CD rats orally exposed (gavage) (GD14–21), 0–25–750 mg/kg/d (25 mg/kg not expected to induce observable effect in offspring)	NMR of 24-h urine samples (GD18 and PND21). PCA and PLS-DA regressions.	In the low-dose group, modifications of metabolites derived from citrate cycle (isocitrate, 2-oxoglutarate) and amino acid catabolism (hippurate, acetoacetate) in urine of dams at GD18; at PND21, modifications in oxaloacetate, asparagine, xanthine, quinolinate. In male pups at PND21, in the low-dose group with no measurable reproductive endpoint, modifications in glycine, serine and threonine pathways, and alanine metabolism	Sumner et al. (2009)
DEHP	Male C57BL/6J mice orally exposed (gavage), 14 d, 0–30–180–1100 mg/kg/d	NMR of plasma (d 14) and liver extract. LDA regressions	Increased glutamine, glycerol and glyceryls and decreased valine concentrations in plasma, increase in glycerophosphocholine and glutamine, decrease in tyrosine/phenylalanine, 3-hydroxybutyrate/valine and isoleucine concentrations in the liver	Eveillard et al. (2009)
DnBP	Pregnant C57 mice, gastric intubation on GD7–9, 0–50–300 mg/kg/d	GC-TOF-MS of maternal serum, placenta, and fetal brain tissue extract (GD16). PCA and PLS-DA regressions	No significant effect on fetal development at 50 mg/kg/d but at two doses, disruption of maternal and fetal metabolic profiles: altered citrate cycle, amino acid, purine and lipid metabolism.	Xia et al. (2011)
DEHP and **DnBP**	Adult male and female Wistar rats orally exposed (diet), 28 d 0–DEHP 3000 ppm–DBP 150–1000–7000 ppm in the diet.	GC, LC-MS and SPE-LC-MS/MS analyses of plasma from blood samples collected at d 7, 14, 28. Linear mixed effects models	Significant increase in liver weight at the higher dose (individual phthalates) or at all doses (mixture). The combination of DEHP and DBP at the higher dose resulted in a metabolic change very similar to a combination of the individual phthalate. The changes concern typical metabolites that were affected with compounds known to be inducers of peroxisome proliferation.	Van Ravenzwaay et al. (2010)
DEHP and **Arochlor 1254**	Kunming mice orally exposed (gavage), 12 d, 0–DEHP 15 mg/kg/d and Arochlor 1254 7.5 mg/kg/d	LC-TOF-MS analyses of plasma and liver extracts collected at d 12. PCA regressions.	Significant increase in liver weight. Disturbance of tryptophan and phenylalanine metabolisms and of lipid metabolism leading to an accumulation of lipids in the liver.	Zhang et al. (2012b)
Bisphenol A	Pregnant CD-1 mice, subcutaneously exposed (GD8–PND16), 0–0.025–0.25–25 µg/kg/d	NMR analyses of blood, brain and liver samples of the male offspring at PND2 and 21. PLS-DA regressions.	Disruption in the glycolysis, glycogenesis and energy metabolism at very low doses. Confirmation of brain development alterations (decrease in glutamate and GABA concentrations in brain).	Cabaton et al. (2013)
Bisphenol A	Male Spague-Dawley rats orally exposed (gavage) for 8 wk (6 d/wk), 0–50 mg/kg/d	HPLC-QTOF (MS) analyses of testis extracts. Wilcoxon (comparison of levels between treatment groups) and Pearson (correlations) tests.	Decreased testicular levels of linoleic acid and increase of arachidonic acid in the testes of the exposed group. Associated with a decrease of antioxidant enzyme levels.	Chen et al. (2012)

Downloaded by [Nathalie Bonvallot] at 01:53 10 March 2014

Endosulfan	Male and female C57 BL/6J mice orally exposed from mating to PND21. Offspring exposed during 11 wk after lactation. 0–30 μg/kg food (corresponding to its ADI)	NMR analyses of blood, bone marrow and liver extracts. PCA and PLS-DA regressions.	Decrease in plasma LDL, VLDL and choline levels and increase in plasma glucose levels in female. Increase in plasma lactate and glucose levels in male. In bone marrow, decrease in fatty acids, increase in valine and isoleucine for both males and females. Gender differences observed for lysine, alanine, succinate, glutamate/glutamine (changes in female) and acetate, tyrosine and inosine (changes in males). In liver, decrease in oxidize glutathione and increase in taurine and betaine levels possibly linked to a disturbance of oxidative status.	Canlet et al. (2013)
Endosulfan, atrazine and **chlorpyrifos**	Same protocol than Canlet et al. (2013) described above. Doses: 0–atrazine 25–chlorpyrifos 50–endosulfan 30 μg/kg food (corresponding to their ADI)	NMR analyses of blood, bone marrow and liver extracts. PCA and PLS-DA regressions.	Changes to amino acid metabolism (proline, glutamate, leucine, isoleucine, valine), citrate cycle (valine), urea cycle (creatine), and glucose metabolism.	Demur et al. (2013)
Metoxychlor	Ovariectomized female SD rats orally (diet) or subcutaneously exposed during 3 d. 0–50–100–200 mg/kg/d	NMR analyses of urine samples. PCA and PLS-DA regressions.	Significant increase in uterine and vaginal weight at all oral dose and at 200 mg/kg/d subcutaneous. Decrease of acetate, benzoate, lactate, glycine, and alanine in a dose-dependent manner.	Kim et al. (2009)
Chlorpyrifos and **carbaryl**	Male and female Wistar rats orally exposed (gavage) during 90 d. Chlorpyrifos: around 0–1–3–7 mg/kg/d. Carbaryl: around 0–5–10/17–25/42 mg/kg/d (respectively for male and female).	NMR analyses of serum samples. PCA and PLS-DA regressions.	No significant histopathological changes in liver and kidney tissues. Discrimination of exposure groups (middle and high): decrease in lactate, alanine, LDL/VLDL, increase in 3-hydroxybutyrate, *N*-acetylglycoprotein, acetone, succinate, choline (dose-dependent) in both gender. Increase in taurine, glucose, and amino acids in male, and increase in leucine/isoleucine and pyruvate in female → disturbance in energy and fatty acid metabolism in the liver mitochondria.	Wang et al. (2009)
Chlorpyrifos and **carbaryl**	Same protocol as in Wang et al. (2009) described above.	NMR analyses of 24-h urine samples collected after treatment. PCA and PLS-DA regressions.	No signs of toxicity, no serum ChE activity, no significant histopathological changes in liver and kidney tissues (pesticides alone or in combination). Changes in metabolite levels in urine in the low-dose group. Increase in glycine, succinate, citrate, 2-oxoglutarate, glutamine, alanine, lactate, dimethlyglycine, dimethylamine, and glucose. Confirmation of the previous findings, especially the impact on the energy metabolism.	Wang et al. (2011)

(*Continued*)

Downloaded by [Nathalie Bonvallot] at 01:53 10 March 2014

TABLE 1. (*Continued*)

Chemical(s)	Experimental design	Analyses	Main findings	Reference
Dichlorvos and **deltamethrin**	Male Wistar rats per group orally exposed (gavage) for 90 d. Dichlorvos: 0.64, 1.60, and 4.00 mg/kg/d Deltamethrin: 1.02, 2.56, and 6.40 mg/kg/d	NMR analyses of serum and 24-h urine samples. PCA analyses.	All groups of exposure had significantly lower cholinesterase activity compared to the control. PCA score plots reveal that all urine and serum samples were clearly distinct from the control. The results suggest that a chronic exposure to dichlorvos, deltamethrin or both, disrupts the energy metabolism of the liver and reduced kidney function (involved metabolites: lactate, dimethylamine, glycine, dimethylglycine, alanine, TMAO, choline, VLDL/LDL, acetone).	Wang et al. (2013), chemico-biological interaction
Propoxur	Male Wistar rats orally exposed (gavage) for 28 d, 0–0.68–3.4–17 mg/kg/d	NMR analyses of urine and plasma samples. PCA with mean centering processed.	Hepatocellular necrosis and vacuolization in the high-dose group, slightly hitopathological changes in the middle group, no changes in the low-dose group, even the low-dose group exhibited a separation of the urine profiles from the control spectra, with an induction of oxidative stress and alteration of the energy and lipid metabolism (enhancement of ketogenesis and fatty acid beta-oxidation) in the liver.	Liang et al. (2012a, 2102b)
Propoxur and Permethrin	Male Wistar rats orally exposed (gavage) for 90 d, 0–0.68–1.7–4.25–12–30–75 mg/kg/d	NMR analyses of urine and plasma samples. PCA and PLS-DA regressions.	All urine and plasma samples clearly distinct from the control. Modification of taurine, creatinine, glucose, lactate, acetate, 3-hydroxybutyrate, alanine, trimethylamine, suggesting hepatotoxicity and nephrotoxicity.	Liang et al. (2012c), bioanalysis
Dichlorvos	Male Wistar rats orally exposed (drinking water) for 24 wk. 0–2.4–7.2–21.6 mg/kg/d	UPLC-QTOF-MS analyses of blood and urine samples. PCA and PLS-DA regression.	Significant changes in clinical parameters (decrease of serum ChE activity in the two higher dosages, increase in serum liver enzymes), associated with disturbances in the carbohydrate and fatty acid metabolism, and anti-oxidant system. Only dimethylphosphate, a metabolite of the dichlorvos, is significantly increased in the low-dose group.	Yang et al. (2011, 2013)
Dimethoate	Male Wistar rats orally exposed (drinking water) for 24 wk. 0–0.04–0.12–0.36 mg/kg/d The lower dose corresponds to the NOAEL in a 2-yr previous study	UPLC-TOF-MS analyses of urine and plasma samples. PCA and PLS-DA regressions.	Significant changes in the clinical parameters in the middle and high dose groups (decrease in serum ChE activity, increase in serum liver enzymes) associated with an impairment of the lipid, fatty acid, and amino acid metabolism, citrate cycle and the anti-oxidant system (decrease in sphingolipids, arachidonic acid, isovalerylglutamic, uric, suberic and citric acids and allantoin, increase in L-tyrosine and lysophosphatidylcholines). Dimethoate could be involved in the impairment of the liver and brain. An increase in dimethoate metabolites was also observed in a dose-dependent manner.	Feng et al. (2012)
Acephate	Male Wistar rats orally exposed (drinking water) for 24 wk. 0–0.5–1.5–4.5 mg/kg/d	UPLC-MS analyses of urine. PCA and PLS-DA regressions.	Compared with the control group, in the middle- and high-dose groups, uric acid and 7-methylguanine increased, while creatinine, aspartyl-L-proline, glycylproline, 5-methylcytosine and D-glucuronic acid decreased. This study demonstrated that an exposure to acephate led to renal injury and perturbed glucose, nucleic acid, and protein metabolism in rat. Dimethylthiophposphate considered as a biomarker of exposure.	Hao et al. (2012)

Downloaded by [Nathalie Bonvallot] at 01:53 10 March 2014

Phorate	Male Wistar rats orally exposed (drinking water) for 24 wk. 0–0.05–0.15–0.45 mg/kg/d	UPLC-MS analyses of urine. PCA and PLS-DA regressions.	Compared with the control group, in the middle- and high-dose groups, uric acid, suberic acid, citric acid, creatinine, kynurenic acid, and xanthurenic acid significantly decreased, whereas indoxyl sulfic acid, cholic acid, and 7-methylguanine increased. Associated with an increase in hepatic enzymes and a decrease in cholinesterase levels. The authors suggest a disturbance in energy metabolism, liver and kidney function, antioxidant system and DNA damage. Finally, diethylthiophosphate considered as a biomarker of exposure (increased).	Sun et al. (2012a)
Organo-phosphates pesticides (mixture)	Male Wistar rats orally exposed (drinking water) for 24 wk: dichlorvos: 0–2.4–7.2–21.6; dimethoate: 0–0.04–0.12–0.36; acephate: 0–0.5–1.5–4.5; phorate: 0–0.05–0.15–0.45 mg/kg/d	UPLC-MS analyses of urine. PCA and PLS-DA regressions.	The metabolic profiles were modified in all treatment groups (the lowest dose corresponds to the combination of the NOAEL of the 4 pesticides), with an increase in 7-methylguanine, ribothymidine, cholic acid, 4-pyridoxic acid, kynurenine, and indoxyl sulfate levels, and a decrease in hippuric acid, creatinine, uric acid, genistic acid, C18-dihydrosphingosine, phytosphingosine, suberic acid, and citric acid. The authors suggest that the mixture induced DNA damage, oxidative stress, and an impairment of the metabolism of lipids, and energetic metabolism at very low levels (corresponding NOAELs).	Du et al. (2013)
Tributyl-phosphate	Male SD rats orally exposed (gavage) one time with 15 mg/kg	NMR analyses of 24-h urine samples. Hierarchical clustering and PCA.	Disturbance of the energy metabolism with changes in citrate cycle metabolites (decrease in citrate, cis- and trans-aconitate, 2-oxoglutarate, succinate, fumarate, benzoate, trigonelline and carnosine). Increase in dibutylphosphate (metabolite of tributylphosphate) in a dose-dependent manner.	Neerathilingam et al. (2010)
Perfluoro-dodecanoic acid	Male SD rats orally exposed (gavage) during 110 d. 0–0.05–0.2–0.5 mg/kg/d	NMR analyses of kidney tissues (aqueous and lipid extracts) and kidney free amino acid profile analyses by LC-ESI-MS. PCA and PLS-DA regressions.	Disorders in glucose and amino acid metabolism with significant alterations in the kidney amino acid profiles (Increase in amino acids, creatine, choline, myo-inositol, xanthine, hypoxanthine, ciotinamide, decrease in phosphorylcholine, betaine, glycine, glucose, and inosine). Significant variations in the lipid content of renal tissues in the higher dose group (increase in cholesterol ester, fatty acids, phosphatidylcholine/phosphatidylethanolamine, decrease in triglycerides).	Zhang et al. (2011a)
Benzene	Male C3H/He mice exposed to benzene by subcutaneous injection for 30 d (5 d/wk), 0–150–300 mg/kg	LC-MS analyses of urine samples. PCA and PLS regressions.	Hypoxanthine, spermidine, 4-aminohippuric acid, indolelactic acid, and glutamylphenylalanine modified between the exposure groups and identified as potential biomarkers of benzene-induced toxicity. Urine metabolomics could be a more sensitive tool to detect benzene-induced toxicity compared to body weight or blood parameter changes.	Sun et al. (2012b)

(*Continued*)

Downloaded by [Nathalie Bonvallot] at 01:53 10 March 2014

TABLE 1. (*Continued*)

Chemical(s)	Experimental design	Analyses	Main findings	Reference
Acrylamide	Male F-344 rats orally exposed (drinking water) for 14 d, 50 mg/kg/d	UPLC-MS and NMR of urine samples (d14). PCA.	Changes in the dose group related to glutathione, citrate cycle, and amino acid metabolism. A weight loss was also observed in the exposed group compared to the control.	Sun et al. (2010)
Pesticide mixture	Female and male C57 BL/6J mice orally exposed (gavage) 3 times a week for 4 wk. Alachlor, diazinon, endosulfan, maneb, mancozeb, captan, at doses corresponding to their respective ADI	NMR spectra of liver extracts. PCA and LDA regressions.	Modification in hepatic metabolites involved in the oxidative stress and glucose metabolism.	Mehri et al. (2010)
Polluted drinking water from the Taihu Lake (China)	Male Mus musculus mice orally exposed (drinking water) for 90 d. No pollutants measurement/pollution includes organochlorines and polycyclic aromatic hydrocarbons.	NMR spectra of serum samples. PCA, PLS-DA regression (with OSC filter).	Perturbations of energy metabolism and amino acid metabolism (decrease in pyruvate, glutamine, arginine, lysine, *N*-acetyl-glycoproteins, choline and citrate levels in blood).	Zhang et al. (2011b)

Downloaded by [Nathalie Bonvallot] at 01:53 10 March 2014

several amino acid concentrations (glutamine, valine, tyrosine/phenylalanine, isoleucine) in the plasma and liver extracts from male mice (NMR analyses, OPLS statistical data treatment), leading Eveillard et al. (2009) to suggest a new hepatic pathway targeted by DEHP exposure in mice to explain potential for endocrine disruption. In utero, DEHP was also shown to affect lipid profiling in the fetal rat brain (Xu et al., 2007), which may lead to aberrant neurodevelopment. More recently, Xia and co-workers (2011) combined the analyses of multiple biological matrices, including maternal serum, placenta, and fetal brain tissue in order to evaluate the teratogenic effects of di-*n*-butyl phthalate (DBP) in mice. By means of GC time-of-flight MS combined with PLS-DA, Xia et al. (2011) showed that DBP disrupted maternal and fetal metabolic profiles, altering citrate cycle, amino acid, purine, and lipid metabolism. Van Ravenzwaay et al. (2010) used metabolomics based on MS analyses of plasma samples to investigate possible interactions resulting from combined exposure to DEHP and DBP in rats. Data demonstrated that simultaneous exposure to high dosages of the mixture (3 mg/kg feed) over a period of 28 d resulted in a profile that was significantly different from the individual compounds. However, these effects were less than additive, and inconsistent changes were observed at lower doses. Coexposure to DEHP and Aroclor 1254 was found to disturb lipid metabolism, leading to an accumulation of lipid in liver (Zhang et al., 2012). Tryptophan and phenylalanine metabolism was also disturbed in this case. Recently, Cabaton et al. (2013) postulated that metabolism of mice perinatally exposed to bisphenol A (BPA) may be disrupted. After subcutaneous low-dose BPA administration (0.025 to 25 μg/kg body weight [BW]/d) to pregnant mice from gestational day 8 through d 16 of lactation, results showed a disruption in glycolysis, glycogenesis, and energy metabolism both at postnatal day 2 and 21. Cabaton et al. (2013) also confirmed BPA-induced brain development alterations with a decrease in glutamate and GABA concentrations in brain samples noted at postnatal day 21.

Some investigators indicated the potential of metabolomics in pesticide research (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011). Kim and co-workers (2009) investigated the metabolic profile of methoxychlor, an organochlorine (OC) insecticide. The NMR analyses of urine samples from female rats showed a decrease of acetate, benzoate, lactate, glycine, and alanine in a dose-dependent manner (Kim et al., 2009). Canlet et al. (2013) recently showed the impact of endosulfan, another OC insecticide, on the metabolic profile of blood, bone marrow, and liver in mice orally treated for 11 wk to a level corresponding to the acceptable daily intake (ADI). A decrease in plasma low-density lipoprotein (LDL), very low-density lipoprotein (VLDL), and choline concentrations and an increase in plasma glucose levels were observed, associated with a potential hepatic oxidative disturbance. Demur et al. (2013) also demonstrated modification of amino acid metabolism, citrate cycle, urea cycle, and glucose metabolism in mice orally exposed to the same dose of endosulfan combined with atrazine and chlorpyrifos (exposure levels corresponding to their respective ADI). Wang and co-workers (2009, 2011) examined the metabolic profiles of rats following exposure to chlorpyrifos and carbaryl, two anticholinesterase insecticides known to be neurotoxic in mammals. Serum analyses suggested that exposure (alone or in combination) produced a disturbance in energy and fatty acid metabolism in liver mitochondria. Metabolomic analysis of urine confirmed these conclusions, especially in terms of impact on the energy metabolism (Wang et al., 2011). Liang et al. (2012a, 2012b) investigated the metabolomic responses of rats to propoxur, another anticholinesterase insecticide. The NMR analysis of urine samples indicated induction of oxidative stress, and alterations in energy and lipid metabolism as evidenced by enhancement of ketogenesis and fatty acid beta-oxidation in liver contributing to hepatotoxicity induced by this insecticide, as previously shown for chlorpyrifos and carbaryl (Wang et al., 2009, 2011). The effects of combined exposures to oganophosphorus (OP) insecticides (dichlorvos

Downloaded by [Nathalie Bonvallot] at 01:53 10 March 2014

or propoxur) with pyrethroids (deltamethrin or permethrin), showed that, even at doses not exhibiting any clinical or physiopathological effects, tested individually or in combination, these exposures disrupted energy metabolism of liver and induced potential nephrotoxicity (Wang et al., 2013; Liang et al., 2012c). Similar findings were noted after oral and chronic exposures (drinking water) to dichlorvos in rats with disturbances in the carbohydrate and fatty acid metabolism, end in the anti-oxidant system (Yang et al., 2011, 2013). Feng et al. (2012) examined the metabolic changes in rats induced by chronic oral exposure (via drinking water) to dimethoate, an OP insecticide. Data demonstrated significant changes in urinary and plasma metabolic UPLC-MS fingerprints, especially for L-tyrosine, citric, uric, and suberic acids, glycylproline, allantoin, isovalerylglutamic acid, and lipids, as well as urinary OP metabolites. Feng et al. (2012) suggested a link between these changes and the impairment of the hepatic and nervous systems. A series of other chronic studies in rats on OP insecticides also showed renal damage and perturbed glucose, nucleic acid, and protein metabolism (for acephate) (Hao et al., 2012), disturbance in energy and lipid metabolism, oxidative stress, and DNA damage (for phorate) (Sun et al., 2012a). This series of studies demonstrates the ability of the metabolomics approach to identify metabolic pathways modified by environmental contaminants and suggest hypotheses regarding their potential mechanism of action. Further, as was observed for BBP, DBP, and some OP pesticides, metabolomics may, in some cases, be more sensitive on a dose scale than histopathology or clinical blood biochemistry in recognizing early toxicological events.

Several other contaminants were investigated in rodents. Neerathilingam et al. (2010) showed a disturbance of the energy metabolism with changes in citrate cycle metabolites in 24-h urine collection of rats exposed to tributylphosphate (an OP widely used as a solvent, extractant, or plasticizer). The adverse renal response to perfluorododecanoic acid, a perfluorinated carboxylic chemical, was also identified in male rats as contributing to disorders in glucose and amino acid metabolism (Zhang et al., 2011a). A modification of the urinary profile of mice subchronically exposed to benzene was described, even at a dose that does not elicit changes in body weight or blood parameters (Sun et al., 2012b). Changes related to glutathione, citrate cycle, and amino acids metabolism were observed in the urinary profile of rats exposed to acrylamide (Sun et al., 2010).

These observations indicate that metabolomics represents a promising tool for studying contaminant toxicity and mode of action, as well as for investigating the effects of mixtures of xenobiotics. However, in the case of environmental applications, most toxicological studies suffer from a lack of similarities with human exposure conditions, in particular through the use of high doses of a single chemical or simple mixture. Few low-dose studies are available in the case of chemical mixtures. Du et al. (2013) investigated the effects of a mixture of low doses (corresponding to the no-observed-adverse-effect level [NOAEL] in a 2-yr study) of four OP pesticides (dichlorvos, dimethoate, acephate and phorate) and found disturbance in energy and lipid metabolism, oxidative stress, and DNA damage. Mehri et al. (2010) examined the effects in mice of a mixture of low doses (derived from their respective acceptable daily intakes) of six pesticides frequently found in fruits and vegetables grown in France and showed a metabolic signature linked to oxidative stress and glucose regulation. Similarly, the metabolic dysfunction of contaminated water from a lake that is an important drinking-water source for a nearby city in China was investigated in male mice. The water contaminants included polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and OC insecticides. Zhang et al. (2011b) found that ingestion of drinking water induced liver damage with alterations in energy and amino acid metabolism.

Besides this metabolic profiling obtained in urine, plasma, or tissue extracts from mammals exposed either orally or subcutaneously, more mechanistic studies were undertaken

Downloaded by [Nathalie Bonvallot] at 01:53 10 March 2014

with cell lines, both in animals—for example, neuronal cultures exposed to methylmercury and mercury chloride (van Vliet et al., 2008)—and in human lung epithelial cells exposed to cigarette smoke or hepatocellular carcinoma-derived cells exposed to ammonia (Vulimiri et al., 2009; Shintu et al., 2012).

Given the limitations of experimental toxicology, the best strategy for identification of metabolic disturbances in environmental health will be to set up studies directly targeted on the human populations. Most metabolomics studies carried out in humans focus on clinical research and identification of biomarkers for early detection in pathologies such as cancer, heart disease, or adverse pregnancy outcomes (Diaz et al., 2011; Kenny et al., 2008; Mamas et al., 2011; Kim et al., 2010). These studies are based on a comparison of a small number of individuals affected by the disease versus healthy subjects. These studies are promising in terms of discovery of biomarkers to aid disease diagnosis, because predetermined pathologies exert a major influence on the metabolic pathway of an organism, facilitating identification of discriminant metabolites between cases and controls. Environmental epidemiology aims at finding subtle metabolic disturbances resulting from chronic low-level exposure to multiple pollutants. Metabolomics is not well developed in this field of research because metabolic modifications expected with environmental exposures are thought to be minor in comparison with interindividual variability that can be observed in a human population. To our knowledge, only four studies have taken an interest in modification in urinary or blood metabolic profiles associated with human environmental exposures. The first of these concerned 51 workers exposed to welding fumes in Taiwan. Kuo et al. (2012) found an increase of metabolites involved in inflammatory and oxidative tissue injury processes, especially glycine, taurine, and betaine. The second investigation examined urinary metabolic profiles in 178 human volunteers living near a source of environmental cadmium (Cd) pollution in Great Britain. Several metabolites involved in mitochondrial metabolism (citrate, 3-hydroxyisovalerate, and 4-deoxy-erythronic acid) and amino acid metabolism (dimethylgycine, creatine and creatinine) were associated with Cd exposure, suggesting oxidative stress, which was confirmed by an increase of urinary 8-oxo-deoxyguanosine levels (Ellis et al., 2012). The third study focused on 83 pregnant women living in a French agricultural area (Brittany). As a surrogate of environmental pesticide exposure, the surface area of land dedicated to agricultural cereal activities in their towns of residence was used to categorize women into three groups. Data showed modifications in urinary metabolites involved in oxidative stress and energy metabolism as evidenced by an increase in glycine, threonine, lactate, and glycerophosphocholine and a decrease in citrate in the most exposed women after adjusting for the main potential confounders (age, body mass index, parity, and smoking) (Bonvallot et al., 2013). The largest of these investigations was a large-scale epidemiological study including more than 4,000 individuals, which was conducted to investigate metabolic variations within 4 different population groups with different dietary patterns (Asian, North American, and European). The urinary metabolic excretion patterns were discriminated between populations having contrasting lifestyles, diets, and pathology risk factors, in particular blood pressure and cardiovascular disease (Holmes et al., 2008). Such a large-scale metabolic approach may be useful in identifying the main interactions between lifestyle, diet, genetics, and environmental exposures.

DISCUSSION

Metabolomic studies in environmental health may represent a reliable way of identifying new biomarkers linked with pollutant exposures and suggesting hypotheses for a better understanding of the mechanistic pathways associated with metabolic changes. This review enables one to identify some issues in order to derive an ideal design from an environmental health perspective; this ideal design needs to be as simulate as much as possible an experimental

situation where the only modifying factor would be environmental exposure, that is, without confounding factors. Both toxicology and epidemiology have advantages and limitations. In toxicology, the controlled conditions of simple mixtures limit variability and confounding factors, but the difficulty lies in closely simulating realistic human exposures (number of pollutants and levels of exposure). Epidemiology allows the complexity of human exposures to be taken into account yet requires the definition of strategies aimed at reducing the number of confounding factors. These observations involve development of new original environmental health strategies that combine both human and animal studies. The main challenges in study design, recruitment of individuals or definition of exposure groups, sampling strategy, statistical tools used, pathway analysis, and system biology are briefly described next.

Study Design, Recruitment of Individuals and Definition of Exposure Groups

The use of metabolomics in environmental epidemiology requires an improvement in experimental protocols to optimize reliability, reproducibility, and sensitivity. One solution is the use of large-scale studies such as metabolome-wide association studies or metabolic phenotyping for which optimal protocols such as sampling strategies, analyses and processing have been largely described elsewhere (Bictash et al., 2010; Dumas et al., 2006). The importance in these studies mainly lies in the possibility of studying both phenotypic and cultural/environmental factors (especially diet). At this scale, it is possible to link metabolic profiling with the presence of risk factors or disease. In the study from Holmes et al. (2008), cultural differences and diet were considered as a surrogate for environmental differences, without acknowledgment of direct contaminant exposures. The same issues might be expressed for environmental epidemiology on a smaller scale. Further, in this case, three main challenges may be described:

1. Limitation of inter- and intraindividual variability within groups being compared: The population studied needs to be sufficiently homogeneous to reduce uncontrolled variability, especially in terms of diet. This may be achieved through selection of culturally similar individuals (Lenz et al., 2004) having the same gender, age, and physiological conditions such as body mass index and without specific pathologies or medication.
2. Limitation of coexposure and other confounding factors: This could be achieved by making all covariables such as diet (the most important covariable in environmental health) homogeneous by choosing culturally similar individuals. In addition, it is advised that the number of individuals be sufficient to take into account noncontrollable variability. However, providing a minimal number of subjects is almost impossible in metabolomics due to poor knowledge of variability of endogenous metabolites in all biological fluids, cells or tissues.
3. The choice of a contrasted environmental exposure between groups of individuals: in this case, in environmental epidemiology, geographical indicators may be used as a surrogate for complex and multiple exposures, since some studies found that residential proximity to anthropic activities might increase exposure to pollutants. This is well established with pesticides exposure and agricultural area (Jamin et al., 2013; Munoz-Quezada et al., 2012; Gunier et al., 2011; Bradman et al., 2011). However, the measurement of environmental exposures remains a challenge. Exposure needs to be assessed in different ways correlating biological measurements with geographical indicators. In toxicology, the challenge remains in the definition of exposures as similar as possible to human exposures, taking into account their complexity in terms of both number of pollutants and choice of dose levels. Few toxicological studies are designed using these hypotheses (Cabaton et al., 2013; Zhang et al., 2011b; Mehri et al., 2010).

Downloaded by [Nathalie Bonvallot] at 01:53 10 March 2014

Downloaded by [Nathalie Bonvallot] at 01:53 10 March 2014

Biological Sampling Strategy

Type of biological fluid and sampling and storage conditions are essential to the design of sampling strategy (Alvarez-Sanchez et al., 2010b). Blood and urine metabolic profiles are now preferred over other biological fluids because these embody a large number of metabolic pathways representative of entire metabolism of an organism. Other biological fluids such as saliva or hair are becoming emerging media due to the noninvasiveness of their sampling procedures (Zhang et al., 2012; Bessonneau et al., 2013; Neyraud et al., 2013). The moment of collection for each individual needs to be as similar as possible since there is considerable intraindividual variability depending on time of day or night, especially for urine. Finally, storage conditions need to be closely controlled to avoid microbial contamination or degradation, and need to be the same as for all samples analyzed in order to reduce interindividual variability. Few studies have directly discussed storage conditions for metabolomics methodology. Some investigations found low metabolic degradation where samples are frozen immediately, or at most 24 h following collection at ambient temperature (Maher et al., 2007). This was confirmed by Peakman and Elliott (2008), who tested sample stability at 4°C and 18°C in different studies and showed integrity of the samples maintained at 4°C at least up to 24 h. Dunn et al. (2008) also noted that analytical variance was of the same magnitude as variance observed between samples stored at 4°C for 0 or 24 h (no statistical significant changes between the 2 storage conditions). Similarly, a long period of freezing (–40° C for urine and –80° C for blood, for 9 mo) did not appear to exert any marked impact on the metabolic profile (Beckonert, 2007). Recently, Hebels et al. (2013) studied the influence of long-term storage of blood samples for omics analysis in environmental health research. No trend was observed in relation to storage temperature after immediate thawing (storage at –80°C from several weeks to several months) (Hebels et al., 2013). Although one study found minimal effects of storage temperature (over a period of 1 wk) on human plasma lipids profiles (tested conditions: 4°C, –20°C, and –80°C) (Zivkovic et al., 2009), Deprez et al. (2002) showed more changes following storage at 4°C or at room temperature on rat plasma samples. The changes observed might be due to lipid hydrolysis (Deprez et al., 2002). However, even though a few studies reported significant modifications of metabolic profiles in plasma, in order to define the most rigorous study design, it would be preferable to have immediate freezing of biological samples directly after collection to prevent changes and decrease possible variability observed between samples.

Analytical Methods

In terms of their advantages and limitations, both NMR and MS techniques appear to be highly complementary. On the one hand, the ease of sample preparation and rapid analysis time provided by NMR techniques is well adapted to high-throughput fingerprinting, while on the other, the high sensitivity of MS techniques and their ability to measure more metabolites allows for extended metabolome coverage. Indeed, NMR enables measurement of major metabolites (i.e., metabolites in the field of micromolar concentrations) such as amino acids, organic acids, carbohydrates, and lipids. MS is able to detect minor metabolites such as steroids, hormones, neurotransmitters, or other trace compounds, which may be present at concentrations as low as picomolar. In contrast, NMR provides access to highly polar metabolites including sugars and sugar phosphates, which are often difficult to handle using the universal reversed-phase C18-based LC-MS methods, and which may require specific analytical strategies such as hydrophilic (ion) interaction liquid chromatography (HILIC), MS or capillary electrophoresis, and MS coupling (Idborg et al., 2005; Cubbon et al., 2010; Ramautar et al., 2013). It therefore appears relevant that in order to identify dynamic pathways of toxicity, combining the two technologies in metabolomics for environmental health is ideal. As discussed by Bouhifd

et al. (2013), the choice of an analytical tool is generally a compromise between sensitivity and selectivity. However, the combined use of NMR and MS could enable characterization of many more metabolites, not only those related to the functioning of the organism (endogenous metabolites), but also those generated by environmental exposure (traces of pollutants). In addition to the identification of endogenous metabolites, metabolomics is already used in the detection and identification of metabolites arising from xenobiotics, using targeted or semitargeted techniques. Conjugated metabolites of BPA were unambiguously characterized in plasma, urine, and testis from lab rodents orally administered the chemical using targeted profiling (Lacroix et al., 2011; Chen et al., 2012). Semitargeted profiling was used to characterize pesticide metabolites in the urine of pregnant women living in a French agricultural area. Based on a list of numerous pesticides commonly used on French crops, and using UHPLC coupled to HRMS, several metabolites from two fungicides (azoxystrobin and fenpropimorph) were identified in the urine of those women living in areas where cereal crops predominate (Jamin et al., 2013). This approach may be considered to be a first step in the characterization of an "exposome," since it was described for the first time by Wild (2005) and defined as the totality of all exposure over a lifetime.

The term "all exposure" refers to a global approach taking into account not only a variety of sources such as hazardous agents (chemical, physical, biological) as well as social characteristics considered "external exposures," but also all measurable biomarkers such as metabolites, adducts, and biotransformation products considered as markers of "internal exposures." Lioy and Rappaport (2011) and Rappaport (2011) defined two generic approaches for characterizing the exposome: the bottom-up approach characterizing external exposure (environmental contamination and exposure assessment), which is useful in improving prevention strategies in public health, and the top-down approach, which utilizes untargeted omics techniques to identify biomarkers in biological fluids and is useful in improving knowledge regarding the causes of human diseases. In characterizing the global exposure of human populations at different stages of life, metabolomics could make the connection between "external" and "internal" exposures at critical periods of life as described by Athersuch (2012). Vineis et al. (2013) proposed several keys to the development and application of omics technologies (including metabolomics) in environmental epidemiology.

Statistical Analysis

In environmental epidemiology, supervised methods are preferred due to the high level of variability within a human population, often inducing a lack of separation with unsupervised methods such as PCA (Miller, 2007). Cluster analysis and PLS have been already shown to be successful in human studies (Ellis et al., 2012; Bonvallot et al., 2013; Holmes et al., 2008). However, application of a preliminary PCA would be useful in identifying spontaneous separation of outliers.

Biomarker Identification

Currently, metabolite identification remains a key challenge in metabolomics. Although, as previously mentioned, numerous databases have been established and developed in recent years, none of these offer overall coverage of the metabolome. Searching against all databases is necessary, but comparison of information from one database to another is difficult, due to varying data format or data recovery methods used. To improve the biomarker identification step, many bio-informatics tools have been developed encompassing both MS (Zhou et al., 2012; Li et al., 2013) and NMR spectra (Tulpan et al., 2011).

Biological Interpretation

Acquisition of information on the quantities of different metabolites found in biological fluids in normal conditions, and factors influencing their levels in biological fluids in order

Downloaded by [Nathalie Bonvallot] at 01:53 10 March 2014

Downloaded by [Nathalie Bonvallot] at 01:53 10 March 2014

to be able to detect subtle disturbances related to environmental factors, is an important challenge (Vlaanderen et al., 2010). Several studies documented the impact of certain physiological parameters in the metabolic profiles of a normal healthy population. The main factors include, but are not limited to, age (D'Adamo et al., 2010; Gu et al., 2009), gender (Bertram et al., 2009; Kochhar et al., 2006), body mass index (Bertram et al., 2009), and diet ingested 24 h prior to collection (Lenz et al., 2004). These studies are helpful in improving knowledge regarding metabolic variability between healthy individuals, and may be useful in environmental epidemiology. Additional mechanistic information on the metabolic pathways involved in the toxicity of complex mixtures need to be provided from animal experiments. Indeed, the use of environmental health metabolomics in humans is still exploratory and requires the creation of a connection between metabolic modifications that may be observed, early toxicity, and adverse effects on the organism. Ellis et al. (2012) noted an association between modified urinary metabolic profiles and proteinuria. These connections are easier to determine in animals with the use of different doses scales, enabling identification of adverse effects, early toxic effects, and metabolic changes in the same experiment. In this case, given the great diversity of environmental exposures, the challenges lie in the choice of exposure groups and chemical mixtures model that are as close as possible to human exposure and in determination of how the various metabolites are connected in order to regulate cell functioning. The question that needs to be addressed is: What is the biological and health significance in the whole organism of the observed metabolic changes?

The understanding of biological networks is of great interest but still needs significant development, particularly in computational tools (Kholodenko et al., 2012). Progress has been made in the reconstruction of metabolic networks of biological systems, and the mechanisms triggering the shifts of these metabolic networks following exposure to model contaminants. For this, NMR was used, but also high-resolution MS, which allows access to a larger set of metabolites and makes it possible to characterize their exact mass. In order to study the modulation of metabolic networks and gain a better understanding of mechanisms of action of low doses of contaminants, computational models of these networks were developed (Jourdan et al., 2010). Simultaneously, there has been considerable progress in the development of bioinformatic tools and databases (KEGG, (Kanehisa and Goto, 2000) and HMDB (Wishart et al., 2007, 2009, 2013), making metabolomics studies more quantitative and extensive in terms of metabolic coverage. Recent biochemical databases provide information about the interconnectivity of metabolism, which can be automatically polled using metabolomics secondary analysis tools. Starting with lists of altered metabolites, there are two main types of analysis: Enrichment analysis computes which metabolic pathways have been significantly altered, whereas metabolite mapping contextualizes the abundances and significances of measured metabolites into network visualizations (Booth et al., 2013). In this case, targeted metabolomics on particular metabolic pathways could be an interesting perspective in order to explain more in-depth environmental contaminant mechanisms of actions.

Finally, this review showed that although numerous studies are published in the field of toxicology to study the mechanisms of action of environmental pollutants, few epidemiological data give rise to a comprehensive knowledge of what may be observed in humans. The issue of animal-to-human extrapolation, well studied in hazard characterization, is still topical and remains a challenge in metabolomics. A new research strategy is needed in order to understand the significance of the modifications observed in a metabolic profile as well as the validity of the biomarkers identified in toxicology. The role of in vitro metabolomics may have the capacity to meet this challenge with the development of human cell assays and comparison of the mechanisms of action of environmental pollutants between species.

In conclusion, metabolomics may be a powerful tool in environmental health for two main reasons: (1) identification of complex exposure biomarkers, directly in human populations, or the characterization of "internal exposures" as an approximation of the exposome; and (2) identification of modified metabolic pathways allowing the suggestion of hypotheses on mechanisms of toxicity in order to better understand environmental causes of diseases. Although it is not yet well used in humans, there is potential for the development of this technique, associated with classical environmental epidemiology and toxicology, as was shown by the first studies published in this field in recent years. Numerous key challenges were highlighted that need further research, including recruitment of individuals and definition of exposure groups, sampling strategies, analytical and statistical techniques, metabolite identification, and biological/toxicological interpretation. In addition, the relevance of animal-to-human extrapolation remains a dominant issue that requires further study.

FUNDING

We acknowledge financial support from the EHESP School of Public Health, France.

Downloaded by [Nathalie Bonvallot] at 01:53 10 March 2014

REFERENCES

Aliferis, K. A., and M. Chrysayi-Tokousbalides. 2011. Metabolomics in pesticide research and development: review and future perspectives. *Metabolomics* 7: 35–53.

Alvarez-Sanchez, B., F. Priego-Capote, and M. Luque de Castro. 2010a. Metabolomics analysis II. Preparation of biological samples prior to detection. *Trends Anal. Chem*. 29: 120–127.

Alvarez-Sanchez B., F. Priego-Capote, and M. Luque de Castro. 2010b. Metabolomics analysis I. Selection of biological samples and practical aspects preceding sample preparation. *Trends Anal. Chem*. 29: 111–119.

Athersuch, T. J. 2012. The role of metabolomics in characterizing the human exposome. *Bioanalysis* 4: 2207–2212.

Bair E., T. Hastie, D. Paul, and R. Tibshirani. 2006. Prediction by supervised principal components. *J. Am. Stat. Assoc*. 101: 119–137.

Bedair, M., and L. W. Sumner. 2008. Current and emerging mass-spectrometry technologies for metabolomics. *Trends Anal. Chem*. 27: 238–250.

Beger, R. D., J. Sun, and L. K. Schnackenberg. 2010. Metabolomics approaches for discovering biomarkers of drug-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 243: 154–166.

Bertram, H. C., J. O. Duus, B. O. Petersen, C. Hoppe, A. Larnkjaer, L. Schack-Nielsen, C. Molgaard, and K. Michaelsen. 2009. Nuclear magnetic resonance-based metabonomics reveals strong sex effect on plasma metabolism in 17-year-old Scandinavians and correlation to retrospective infant plasma parameters. *Metabolism* 58: 1039–1045.

Bessonneau V., B. Bojko, and J. Pawliszyn. 2013. Analysis of human saliva metabolome by direct immersion solid-phase microextraction LC and benchtop orbitrap MS. *Bioanalysis* 5:783–792.

Bictash M., T. M. Ebbels, Q. Chan, R. L. Loo, I. K. S. Yap, I. J. Brown, M. de Iorio, M. L. Daviglus, E. Holmes, J. Stamler, J. K. Nicholson, and P. Elliott. 2010. Opening up the "black box": Metabolic phenotyping and metabolome-wide association studies in epidemiology. *J. Clin. Epidemiol*. 63: 970–979.

Bonvallot N., M. Tremblay-Franco, C. Chevrier, C. Canlet, C. Warembourg, J.-P. Cravedi, and S. Cordier. 2013. Metabolomics tools for describing complex pesticide exposure in pregnant women in Brittany (France). *PLoS One* 8(5): e64433.

Booth, S. C., A. M. Weljie, and R. J. Turner. 2013. Computational tools for the secondary analysis of metabolomics experiments. *Comput. Struct. Biol. J*. 4: e201301003.

Downloaded by [Nathalie Bonvallot] at 01:53 10 March 2014

Bothwell, J. H. F., and J. L. Griffin. 2011. An introduction to biological nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biol. Rev*. 86: 493–510.

Bouhifd M., T. Hartung, H. T. Hogberg, A. Kleensang, and L. Zhao. 2013. Review: Toxicometabolomics. *J. Appl. Toxicol*. doi:10.1002/jat.2874.

Bradman A., R. Castorina, D. Boyd Barr, J. Chevrier, M. E. Harnly, E. A. Eisen, T. E. McKone, K. Harley, N. Holland, and B. Eskenazi. 2011. Determinants of organophosphorus pesticide urinary metabolite levels in young children living in an agricultural community. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 8: 1061–1083.

Broadhurst, D., and D. B. Kell. 2006. Statistical strategies for avoiding false discoveries in metabolomics and related experiments. *Metabolomics* 2: 171–196.

Cabaton N., C. Canlet, P. R. Wadia, M. Tremblay-Franco, R. Gautier, J. Molina, C. Sonnenschein, J.-P. Cravedi, B. S. Rubin, A. M. Soto, and D. Zalko. 2013. Effects of low doses of bisphenol A on the metabolome of perinatally exposed CD-1 mice. *Environ. Health Perspect*. doi:10.1289/ehp.1205588.

Canlet C., M. Tremblay-Franco, R. Gautier, J. Molina, B. Métais, F. Blas-Y-Estrada, and L. Gamet-Payrastre. 2013. *Specific metabolic fingerprint of a dietary exposure to very low dose of endosulfan. J. Toxicol*. 2013: 545802. http://dx.doi.org/10.1155/2013/545802

Chen M., B. Xu, W. Ji, S. Qiao, N. Hu, Y. Hu, W. Wu, L. Qiu, R. Zhang, S. Wang, Z. Zhou, Y. Xia, and X. Wang. 2012. Bisphenol A alters n-6 fatty acid composition and decreases antioxidant enzyme levels in rat testes: A LC-QTOF-based metabolomics study. *PLoS One* 7: e44754.

Cubbon S., C. Antonio, J. Watson, and J. Thomas-Oates. 2010. Metabolomic applications of HILIC-LC-MS. *Mass Spectrom. Rev*. 29: 671–684.

D'Adamo P., S. Ulivi, A. Beneduci, G. Pontoni, G. Capasso, C. Lanzara, G. Andrighetto, U. Hladnik, V. Nunes, M. Palacin, and P. Gasparini. 2010. Metabonomics and population studies: age-related amino acids excretion and inferring networks through the study of urine samples in two Italian isolated populations. *Amino Acids* 38: 65–73.

Demur C., Métais B., Canlet C., Tremblay-Franco M., Gautier R., Blas-Y-Estradas F., Sommer C., and Gamet-Payrastre L. 2013. Dietary exposure to a low dose of pesticides alone or as a mixture: The biological metabolic fingerprint and impact on hematopoiesis. *Toxicology* 308: 74–87.

Deprez S., B. C. Sweatman, S. C. Connor, J. N. Haselden, and C. J. Waterfield. 2002. Optimisation of collection, storage and preparation of rat plasma for 1H NMR spectroscopic analysis in toxicology studies to determine inherent variation in biochemical profiles. *J. Pharm. Biomed. Anal*. 30: 1297–1310.

Dettmer K., P. A. Aronov, and B. D. Hammock. 2007. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom. Rev* 26: 51–78.

Diaz, S. O., J. Pinto, G. Graça, I. F. Duarte, A. S. Barros, E. Galhano, C. Pita, M. Almeida, B. J. Goodfellow, I. M. Carreira, and A. M. Gil. 2011. Metabolic biomarkers of prenatal disorders: An exploratory NMR metabonomics study of 2nd trimester maternal urine and blood plasma. *J. Proteome Res*. 10: 3732–3742.

Du L., H. Wang, W. Xu, Y. Zeng, Y. Hou, Y. Zhang, X. Zhao, and C. Sun. 2013. Application of ultraperformance liquid chromatography/mass spectrometry-based metabonomic techniques to analyze the joint toxic action of long-term low-level exposure to a mixture of organophosphate pesticides on rat urine profile. *Toxicol. Sci*. doi:10.1093/toxsci/kft091.

Duarte, N. C., S. A. Becker, N. Jamshidi, I. Thiele, M. L. Mo, T. D. Vo, R. Srivas, and B. O. Palsson. 2007. Global reconstruction of the human metabolic network based on genomic and bibliomic data. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 1777–1782.

Dumas, M. E., E. C. Maibaum, C. Teague, H. Ueshima, B. Zhou, J. C. Lindon, J. K. Nicholson, J. Stamler, P. Elliott, Q. Chan, and E. Holmes. 2006. Assessment of analytical reproducibility of 1H NMR spectroscopy

based metabonomics for large-scale epidemiological research: The INTERMAP Study. *Anal. Chem*. 78: 2199–2208.

Dunn W. B., N. J. C. Bailey, and H. E. Johnson. 2005. Measuring the metabolome: current analytical technologies. *Analyst* 130: 606–625.

Dunn, W. B., D. Broadhurst, D. I. Ellis, M. Brown, A. Halsall, S. O'Hagan, I. Spasic, A. Tseng, and D. B. Kell. 2008. A GC-TOF-MS study of the stability of serum and urine metabolomes during the UK Biobank sample collection and preparation protocols. *Int. J. Epidemiol*. 37(suppl. 1): i23–i30.

Ellis J., T. Athersuch, L. Thomas, F. Teichert, M. Perez-Trujillo, C. Svendsen, D. Spurgeon, R. Singh, L. Jarup, J. Bundy, and H. Keun. 2012. Metabolic profiling detects early effects of environmental and lifestyle exposure to cadmium in a human population. *BMC Med*. 10: 61.

Eveillard A., F. Lasserre, M. de Tayrac, A. Polizzi, S. Claus, C. Canlet, L. Mselli-Lakhal, G. Gotardi, A. Paris, H. Guillou, P. G. P. Martin, and T. Pineau. 2009. Identification of potential mechanisms of toxicity after di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) adult exposure in the liver using a systems biology approach. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 236: 282–292.

Feng Z., X. Sun, J. Yang, D. Hao, L. Du, H. Wang, W. Xu, X. Zhao, and C. Sun. 2012. Metabonomics analysis of urine and plasma from rats given long-term and low-dose dimethoate by ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Chem. Biol. Interact*. 199: 143–153.

Fiehn O. 2002. Metabolomics—The link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol. Biol*. 48: 151–171.

Fukushima A. and M. Kusano. 2013. Recent progress in the development of metabolome databases for plant systems biology. *Front. Plant Sci*. 4: 73.

Gu H., Z. Pan, B. Xi, B. E. Hainline, N. Shanaiah, V. Asiago, G. A. N. Gowda, and D. Raftery. 2009. 1H NMR metabolomics study of age profiling in children. *NMR Biomed*. 22: 826–833.

Gunier R. B., M. H. Ward, M. Airola, E. M. Bell, J. Colt, M. Nishioka, P. A. Buffler, P. Reynolds, R. P. Rull, A. Hertz, C. Metayer, and J. R. Nuckols. 2011. Determinants of agricultural pesticide concentrations in carpet dust. *Environ. Health Perspect*. 119: 970–976.

Hao, D. F., W. Xu, H. Wang, L. F. Du, J. D. Yang, X. J. Zhao, and C. H. Sun. 2012. Metabolomic analysis of the toxic effect of chronic low-dose exposure to acephate on rats using ultra-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 83: 25–33.

Hebels, D. G., P. Georgiadis, H. C. Keun, T. J. Athersuch, P. Vineis, R. Vermeulen, L. Portengen, I. A. Bergdahl, G. Hallmans, D. Palli, B. Bendinelli, V. Krogh, R. Tumino, C. Sacerdote, S. Panico, J. C. S. Kleinjans, T. M. C. M. De Kok, M. T. Smith, and S. A. Kyrtopoulos. 2013. Performance in omics analyses of blood samples in long-term storage: Opportunities for the exploitation of existing biobanks in environmental health research. *Environ. Health Perspect*. 121: 480–487.

Holmes, E., R. L. Loo, J. Stamler, M. Bictash, I. K. Yap, Q. Chan, T. Ebbels, M. de Iorio, I. J. Brown, K. A. Veselkov, M. L. Daviglus, H. Kesteloot, H. Ueshima, L. Zhao, J. K. Nicholson, and P. Elliott. 2008. Human metabolic phenotype diversity and its association with diet and blood pressure. *Nature* 453: 396–400.

Idborg H., L. Zamani, P. O. Edlund, I. Schuppe-Koistinen, and S. P. Jacobsson. 2005. Metabolic fingerprinting of rat urine by LC/MS Part 1. Analysis by hydrophilic interaction liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 828: 9–13.

Jamin E., N. Bonvallot, M. Tremblay-Franco, J.-P. Cravedi, C. Chevrier, S. Cordier, and L. Debrauwer. 2013. Untargeted profiling of pesticide metabolites by LC–HRMS: An exposomics tool for human exposure evaluation. *Anal. Bioanal. Chem*. doi:10.1007/s00216-013-7136-2.

Jourdan F., L. Cottret, L. Huc, D. Wildridge, R. Scheltema, H. Hillenweck, M. P. Barrett,

Downloaded by [Nathalie Bonvallot] at 01:53 10 March 2014

D. Zalko, D. G. Watson, and L. Debrauwer. 2010. Use of reconstituted metabolic networks to assist in metabolomic data visualization and mining. *Metabolomics* 6: 312–321.

Kanehisa, M., and S. Goto. 2000. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*. 28: 27–30.

Kenny, L. C., D. Broadhurst, M. Brown, W. B. Dunn, C. W. G. Redman, D. B. Kell, and P. N. Baker. 2008. Detection and identification of novel metabolomic biomarkers in preeclampsia. *Reprod. Sci*. 15: 591–597.

Kholodenko B., M.B. Yaffe, and W. Kolch. 2012. Computational approaches for analyzing information flow in biological networks. *Sci. Signal*. 5: 1–14.

Kim, K. B., S. H. Kim, S. Y. Um, M. W. Chung, J. S. Oh, S. C. Jung, T. S. Kim, H. J. Moon, S. Y. Han, H. Y. Oh, B. M. Lee, and K. H. Choi. 2009. Metabolomics approach to risk assessment: methoxyclor exposure in rats. *J. Toxicol. Environ. Health A* 72: 1352–1368.

Kim, K. B., J. Y. Yang, S. J. Kwack, K. L. Park, H. S. Kim, D. H. Ryu, Y. J. Kim, G. S. Hwang, and B. M. Lee. 2010. Toxicometabolomics of urinary biomarkers for human gastric cancer in a mouse model. *J. Toxicol. Environ. Health A* 73: 1420–1430.

Kochhar S., D. M. Jacobs, Z. Ramadan, F. Berruex, A. Fuerholz, and L. B. Fay. 2006. Probing gender-specific metabolism differences in humans by nuclear magnetic resonance-based metabonomics. *Anal. Biochem*. 352: 274–281.

Koek, M., R. H. Jellema, J. van der Greef, A. C. Tas, and T. Hankemeier. 2011. Quantitative metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry: Status and perspectives. *Metabolomics* 7: 307–328.

Kuo, C. H., K. C. Wang, T. F. Tian, M. H. Tsai, Y. M. Chiung, C. M. Hsiech, S. J. Tsai, S. Y. Wang, D. M. Tsai, C. C. Huang, and Y. J. Tseng. 2012. Metabolomic characterization of laborers exposed to welding fumes. *Chem. Res. Toxicol*. 25: 676–686.

Lacroix, M. Z., S. Puel, S. H. Collet, T. Corbel, N. Picard-Hagen, P. L. Toutain, C. Viguié, and V. Gayrard. 2011. Simultaneous quantification of bisphenol A and its glucuronide metabolite (BPA-G) in plasma and urine: Applicability to toxicokinetic investigations. *Talanta* 85: 2053–2059.

Lenz, E. M., J. Bright, I. D. Wilson, A. Hughes, J. Morrisson, H. Lindberg, and A. Lockton. 2004. Metabonomics, dietary influences and cultural differences: A 1H NMR-based study of urine samples obtained from healthy British and Swedish subjects. *J. Pharm. Biomed. Anal*. 36: 841–849.

Li, L., R. Li, J. Zhou, A. Zuniga, A. E. Stanislaus, Y. Wu, T. Huan, J. Zhang, Y. Shi, D. S. Wishart, and G. Lin. 2013. My compound ID: Using evidence-based metabolome library for metabolite identification. *Anal. Chem*. 85: 3401–3408.

Liang, Y.J., H. P. Wang, L. Yang, W. Li, and Y. J. Wu. 2012a. Metabonomic responses in rat urine following subacute exposure to propoxur. *Int. J. Toxicol*. 31: 287–293.

Liang, Y. J., H. P. Wang, D. X. Long, and Y. J. Wu. 2012b. (1)H NMR-based metabonomic profiling of rat serum and urine to characterize the subacute effects of carbamate insecticide propoxur. *Biomarkers* 17: 566–574.

Liang, Y. J., H. P. Wang, D. X. Long, and Y. J. Wu. 2012c. Applying biofluid metabonomic techniques to analyze the combined subchronic toxicity of propoxur and permethrin in rats. *Bioanalysis* 4: 2897–2907.

Lindon, J. C., E. Holmes, M. E. Bollard, E. G. Stanley, and J. K. Nicholson. 2004. Metabonomics technologies and their applications in physiological monitoring, drug safety assessment and disease diagnosis. *Biomarkers* 9: 1–31.

Lindon, J. C., and J. K. Nicholson. 2008. Analytical techniques for metabonomics and metabolomics, and multi-omic information recovery. *Trends Anal. Chem*. 27: 194–204.

Lioy, P. J., and S. M. Rappaport. 2011. Exposure science and the exposome: An opportunity for coherence in the environmental health sciences. *Environ. Health Perspect*. 109: A466–A467.

Madsen R., T. Lundstedt, and J. Trygg. 2010. Chemometrics in metabolomics—A review in human disease diagnosis. *Anal. Chim. Acta* 659: 23–33.

Downloaded by [Nathalie Bonvallot] at 01:53 10 March 2014

Maher A. D., S. F. Zirah, E. Holmes, and J. K. Nicholson. 2007. Experimental and analytical variation in human urine in 1H NMR spectroscopy-based metabolic phenotyping studies. *Anal. Chem*. 79: 5204–5211.

Mamas M., W. Dunn, L. Neyses, and R. Goodacre. 2011. The role of metabolites and metabolomics in clinically applicable biomarkers of disease. *Arch. Toxicol*. 85: 5–17.

Merhi M., C. Demur, C. Racaud-Sultan, J. Bertrand, C. Canlet, F. B. Estrada, and L. Gamet-Payrastre. 2010. Gender-linked haematopoietic and metabolic disturbances induced by a pesticide mixture administered at low dose to mice. *Toxicology* 267: 80–90.

Miller, M. G. 2007. Environmental metabolomics: A SWOT analysis (strengths, weaknesses, opportunities, and threats). *J. Proteome Res*. 6: 540–545.

Molinska A., L. Blanchet, L. M. C. Buydens, and S. S. Wijmenga. 2012. NMR and pattern recognition methods in metabolomics: From data acquisition to biomarker discovery: A review. *Anal. Chim. Acta* 750: 82–97.

Munoz-Quezada, M. T., V. Iglesias, B. Lucero, K. Steenland, D. B. Barr, K. Levy, P. B. Ryan, S. Alvarado, and C. Concha. 2012. Predictors of exposure to organophosphate pesticides in schoolchildren in the Province of Talca, Chile. *Environ. Int*. 47: 28–36.

Neyraud, E., M. Tremblay-Francon, S. Gregoire, O. Berdeaux and C. Canlet. 2013. Relationships between the metabolome and the fatty acid composition of human saliva; effects of stimulation. *Metabolomics* 9:213–222.

Peakman, T. C., and P. Elliott. 2008. The UK Biobank sample handling and storage validation studies. *Int. J. Epidemiol*. 37(suppl. 1): i2–i6.

Putri, S. P., S. Yamamoto, H. Tsugawa, and E. Fukusaki. 2013. Current metabolomics: Technological advances. *J. Biosci. Bioeng*. http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.01.004

Ramautar, R., G. W. Somsen, and G. J. de Jong. 2013. CE-MS for metabolomics: developments and applications in the period 2010–2012. *Electrophoresis* 34: 86–98.

Rappaport, S. M. 2011. Implication of the exposome for exposure science. *J. Expos. Sci. Environ. Epidemiol*. 21: 5–9.

Robertson, D. G., P. B. Watkins, and M. D. Reily. 2011. Metabolomics in toxicology: Preclinical and clinical applications. *Toxicol. Sci*. 120: S146–S170.

Robertson, D. 2005. Metabonomics in toxicology: A review. *Toxicol. Sci*. 85: 806–822.

Ross, A., G. Schlotterbeck, F. Dieterle, and H. Senn. 2007. NMR spectroscopy techniques for application to metabonomics. In *The handbook of metabonomics and metabolomics*, ed. J. C. Lindon, J. K. Nicholson, and H. Holmes, 55–112. Elsevier, The Netherlands.

Shintu L., R. Baudoin, V. Navratil, J-M. Prot, C. Pointoizeau, M. Defernez, B. Blaise, C. Domange, A. R. Péry, P. Toulhoat, C. Legallais, C. Brochot, E. Leclerc, and M.-E. Dumas. 2012. Metabolomics-on-a-chip and predictive systems toxicology in microfluidic bioartificial organs. *Anal. Chem*. 84: 1840–1848.

Sumner, S., R. Snyder, J. Burgess, C. Myers, R. Tyl, C. Sloan, and T. Fennell. 2009. Metabolomics in the assessment of chemical-induced reproductive and developmental outcomes using non-invasive biological fluids: Application to the study of butylbenzyl phthalate. *J. Appl. Toxicol*. 29: 703–714.

Sun, X., W. Xu, Y. Zeng, Y. Hou, L. Guo, X. Zhao, and C. Sun. 2012a. Metabonomics evaluation of urine from rats administered with phorate under long-term and low-level exposure by ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Appl. Toxicol*. doi:10.1002/jat.2848

Sun, R., J. Zhang, M. Xiong, Y. Chen, L. Yin, and Y. Pu. 2012b. Metabolomics biomarkers for subacute toxicity screening for benzene exposure in mice. *J. Toxicol. Environ. Health A* 75: 1163–1173.

Sun, J., L. Schnackenberg, L. Pence, S. Bhattacharyya, D. Doerge, J. Bowyer and R. Beger. 2010. Metabolomic analysis of urine from rats chronically dosed with acrylamide using NMR and LC/MS. *Metabolomics* 6: 550–563.

Downloaded by [Nathalie Bonvallot] at 01:53 10 March 2014

Theodoridis, G. A., H. G. Gika, E. J. Want, and I. D. Wilson. 2012. Liquid chromatography–mass spectrometry based global metabolite profiling: A review. *Anal. Chim. Acta* 711: 7–16.

Trygg, J., and S. Wold. 2002. Orthogonal projections to latent structures. *J. Chemometrics* 16: 119–128.

Tuplan, D., S. Léger, L. Belliveau, A. Culf, and M. Čuperlović-Culf. 2011. MetaboHunter: An automatic approach for identification of metabolites from 1H-NMR spectra of complex mixtures. *BMC Bioinfo* 12: 400.

van den Berg, R., H. Hoefsloot, J. Westerhuis, A. Smilde, and M. van der Werf. 2006. Centering, scaling, and transformations: Improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics* 7: 142.

van Ravenzwaay, B., G. Coelho-Palermo Cunha, V. Strauss, J. Wiemer, E. Leibold, H. Kamp, T. Walk, W. Mellert, R. Looser, A. Prokoudine, E. Fabian, G. Krenrish, and M. Herold. 2010. The individual and combined metabolite profiles (metabolomics) of dibutylphthalate and di(2-ethylhexyl)phthalate following a 28-day dietary exposure in rats. *Toxicol. Lett*. 198: 159–170.

van Vliet, E., S. Morath, C. Eskes, J. Linge, J. Rappsilber, P. Honegger, T. Hartung, and S. Coecke. 2008. A novel in vitro metabolomics approach for neurotoxicity testing, proof of principle for methylmercury, mercury chloride and caffeine. *Neurotoxicology* 29: 1–12.

Vineis, P., K. van Veldhoven, M. Chadeau-Hyam, and T. J. Atersuch. 2013. Advancing the application of omics-based biomarkers in environmental epidemiology. *Environ. Mol. Mutagen*. doi:10.1002/em.21764.

Vlaanderen, J., L. E. Moore, M. T. Smith, Q. Lan, L. Zhang, C. F. Skibola, N. Rothman, and R. Vermeulen. 2010. Application of OMICS technologies in occupational and environmental health research; current status and projections. *Occup. Environ. Med*. 67: 136–143.

Vulimiri, S. V., M. Misra, J. T. Hamm, M. Mitchell, and A. Berger. 2009. Effects of mainstream cigarette smoke on the global metabolome of human lung epithelial cells. *Chem. Res. Toxicol*. 22: 492–503.

Wang, H. P., Y. J. Liang, D. X. Long, J. X. Chen, W. Y. Hou, and Y. J. Wu. 2009. Metabolic profiles of serum from rats after subchronic exposutre to chlorpyrifos and carbaryl. *Chem. Res. Toxicol*. 22: 1026–1033.

Wang, H. P., Y. J. Liang, Q. Zhang, D. X. Long, W. Li, L. Li, L. Yang, X. Z. Yan, and Y. J. Wu. 2011. Changes in metabolic profiles of urine from rats following chronic exposure to anticholinesterase pesticides. *Pestic. Biochem. Physiol*. 101: 232–239.

Wang, H. P., Y. J. Liang, Y. J. Sun, J. X. Chen, W. Y. Hou, D. X. Long, and Y. J. Wu. 2013. 1H NMR-based metabonomic analysis of the serum and urine of rats following subchronic exposure to dichlorvos, deltamethrin, or a combination of these two pesticides. *Chem. Biol. Interact*. 203: 588–596.

Waterman, D. S., F. W. Bonner, and J. C. Lindon. 2009. Spectroscopic and statistical methods in metabonomics. *Bioanalysis* 1: 1559–1578.

Werner, E., J. F. Heilier, C. Ducruix, E. Ezan, C. Junot, and J. C. Tabet. 2008. Mass spectrometry for the identification of the discriminating signals from metabolomics: Current status and future trends. *J. Chromatogr. B* 871: 143–163.

Wild, C. P. 2005. Complementing the genome with an "exposome": The outstanding challenge of environmental exposure measurement in molecular epidemiology. *Cancer Epidemiol. Biomarker Prev. BP* 14: 1847–1850.

Wishart, D. S., D. Tzur, C. Knox, R. Eisner, A. C. Guo, N. Young, D. Cheng, K. Jewell, D. Arndt, S. Sawhney, C. Fung, L. Nikolai, M. Lewis, M.-A. Coutouly, I. Forsythe, P. Tang, S. Shrivastava, K. Jeroncic, P. Stothard, G. Amegbey, D. Block, D. D. Hau, J. Wagner, J. Miniaci, M. Clements, M. Gebremedhin, N. Guo, Y. Zhang, G. E. Duggan, G. D. MacInnis, A. M. Weljie, R. Dowlatabadi, F. Bamforth, D. Clive, R. Greiner, L. Li, T. Marrie, B. D. Sykes, H. J. Vogel, and L. Querengesser. 2007. HMDB: The human

Downloaded by [Nathalie Bonvallot] at 01:53 10 March 2014

metabolome database. *Nucleic Acids Res*. 35: D521–D526.

Wishart, D. S., T. Jewison, A. C. Guo, M. Wilson, C. Knox, Y. Liu, Y. Djoumbou, R. Mandal, F. Aziat, E. S. Bouatra, I. Sinelnikov, D. Arndt, J. Xia, P. Liu, F. Yallou, T. Bjorndahl, R. Perez-Pineiro, R. Eisner, F. Allen, V. Neveu, R. Greiner, and A. Scalbert. 2013. HMDB 3.0—The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Res*. 41: D801–D807. doi:10.1093/nar/gks1065.

Wishart, D. S., C. Knox, A. C. Guo, R. Eisner, N. Young, B. Gautam, D. D. Hau, N. Psychogios, E. Dong, S. Bouatra, R. Mandal, I. Sinelnikov, J. Xia, L. Jia, J. A. Cruz, E. Lim, C. A. Sobsey, S. Shrivastava, P. Huang, P. Liu, L. Fang, J. Peng, R. Fradette, D. Cheng, D. Tzur, M. Clements, A. Lewis, A. De Souza, A. Zuniga, M. Dawe, Y. Xiong, D. Clive, R. Greiner, A. Nazyrova, R. Shaykhutdinov, L. Li, H. J. Vogel, and I. Forsythe. 2009. HMDB: A knowledge base for the human metabolome. *Nucleic Acids Res*. 37: D603–D610. doi:10.1093/nar/gkn810.

Wold, S., M. Sjostrom, and L. Eriksson. 2001. PLS-regression: A basic tool of chemometrics. *Chem. Intel. Lab. Syst*. 58: 109–130.

Xia, H. F., Y. Chi, X. Qi, M. M. Su, Y. Cao, P. P. Song, X. Li, T. L. Chen, A. H. Zhao, Y. N. Zhang, Y. Cao, X. Ma, and W. Jia. 2011. Metabolomic evaluation of di-n-butyl phthalate-induced teratogenesis in mice. *Metabolomics* 7: 559–571.

Xu, Y., S. Agrawal, T. J. Cook, and G. T. Knipp. 2007. Di-(2-ethylhexyl)-phthalate affects lipid profiling in fetal rat brain upon maternal exposure. *Arch. Toxicol*. 81: 57–62.

Yang, J., X. Sun, Z. Feng, D. Hao, M. Wang, X. Zhao, and C. Sun. 2011. Metabolomic analysis of the toxic effects of chronic exposure to low-level dichlorvos on rats using ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Toxicol. Lett*. 206: 306–313.

Yang, J., H. Wang, W. Xu, D. Hao, L. Du, X. Zhao, and C. Sun. 2013. Metabolomic analysis of rat plasma following chronic low-dose exposure to dichlorvos. *Hum. Exp. Toxicol*. 32: 196–205.

Zhang, H., L. Ding, X. Fang, Z. Shi, Y. Zhang, H. Chen, X. Yan, and J. Dai. 2011a. Biological responses to perfluorododecanoic acid exposure in rat kidneys as determined by integrated proteomic and metabonomic studies. *PLoS One* 6: e20862-1-11.

Zhang, Y., B. Wu, Z. Y. Zhang, and S. P. Cheng. 2011b. A metabonomic analysis on health effects of drinking water on male mice (*Mus musculus*). *J. Hazard Mater*. 190: 515–519.

Zhang, J., L. Yan, M. Tian, Q. Huang, S. Peng, S. Dong, and H. Shen. 2012a. The metabonomics of combined dietary exposure to phthalates and polychlorinated biphenyls in mice. *J. Pharm. Biomed. Anal*. 66: 287–297.

Zhang, A., H. Sun, and X. Wang. 2012b. Saliva metabolomics opens door to biomarker discovery, disease diagnosis, and treatment. *Appl. Biochem. Biotechnol*. 168: 1718–1727.

Zhou, B, J. Wang, and H. W. Ressom. 2012. MetaboSearch: Tool for mass-based metabolite identification using multiple databases. *PLoS One* 7: e40096.

Zivkovic, A., M. Wiest, U. Nguyen, R. Davis, S. Watkins, and J. German. 2009. Effects of sample handling and storage on quantitative lipid analysis in human serum. *Metabolomics* 5: 507–516.

Downloaded by [Nathalie Bonvallot] at 01:53 10 March 2014

CHAPITRE 2 : OBJECTIFS ET STRATEGIE GENERALE DE LA THESE

1. Objectifs de la thèse

En résumé, les éléments présentés en introduction montrent que l'exposition environnementale aux pesticides pendant les périodes précoces de la vie, et en particulier pendant la période prénatale, serait un facteur de risque de malformations congénitales (triazines), de retard de croissance fœtale et de petit poids de naissance (organochlorés, organophosphorés, triazines), et serait également associée à des conséquences négatives sur la croissance (organochlorés), ainsi que sur le développement cognitif, le comportement, la mémoire, l'acuité visuelle, et la motricité fine des enfants dans les premières années de leur vie (organophosphorés, principalement chez les individus porteurs d'un polymorphisme génétique du gène de la paraoxonase 1). Par ailleurs, vivre en milieu rural ou à proximité d'activités agricoles est un facteur de risque de l'exposition aux pesticides et peut donc être un indicateur utile pour l'étude des effets sanitaires liés à l'exposition à des mélanges de pesticides. Les études toxicologiques récentes conduites sur de nombreux pesticides différents ont clarifié un certain nombre de mécanismes d'action toxiques impliquant les voies métaboliques liées au fonctionnement des mitochondries, à la production de ROS, au métabolisme énergétique et à la régulation de l'insuline.

Compte tenu de la capacité de la métabolomique d'identifier de manière non ciblée, sur des matrices biologiques humaines, des voies métaboliques modifiées lors d'exposition à des xénobiotiques, l'étude de profils métaboliques chez des femmes enceintes et leurs enfants exposés de manière contrastée à des pesticides est particulièrement pertinente pour suggérer des hypothèses mécanistiques en lien avec les effets sanitaires. Le peu de connaissances générées jusqu'à présent par la métabolomique sur des populations générales en santé environnementale justifie une étude à double objectifs.

1) Premièrement, il s'agit de réaliser une étude exploratoire pour tester l'utilité de la métabolomique dans l'étude de l'impact sanitaire lié aux expositions complexes aux pesticides chez la femme enceinte ;

2) Deuxièmement, il s'agit d'améliorer les connaissances sur le rôle des expositions aux pesticides dans le développement de l'enfant sur la base des hypothèses qui pourraient être générées en 1.

Le projet vise à répondre aux questions suivantes :

- Quelle est l'influence d'expositions à de multiples pesticides sur le métabolome de la mère et du nouveau-né ?
- Cette exposition peut-elle être caractérisée par des modifications métaboliques observables ? Quels sont les mécanismes expliquant ces modifications ?
- Quelles seraient les conséquences de ces modifications sur le développement ?

2. Stratégie générale adoptée

En terme de méthode, l'originalité de l'association d'une approche épidémiologique avec une approche toxicologique permet de prendre en compte les avantages de chacune d'entre elles (expositions humaines versus expositions contrôlées). La figure 7 présente la stratégie globale employée pour répondre aux objectifs préalablement identifiés.

Le choix de la population et la constitution des groupes d'exposition sont fondés sur la cohorte bretonne mères-enfants PELAGIE, pour laquelle des échantillons d'urine et de sang de cordon sont disponibles.

A partir d'échantillons biologiques provenant à la fois d'individus humains (population générale, urines et sérums provenant de sang de cordon) et d'animaux de laboratoire exposés ou non aux pesticides (urine, plasma, extraits aqueux et organiques de foie et cerveaux), des prises d'empreintes ont été réalisées par RMN du proton. Le choix d'utiliser la RMN a été guidé par la disponibilité d'un nombre important d'échantillons, la simplicité de préparation de ces échantillons, et surtout le fait qu'ils ne soient pas détruits lors de cette préparation, permettant d'éventuelles analyses ultérieures.

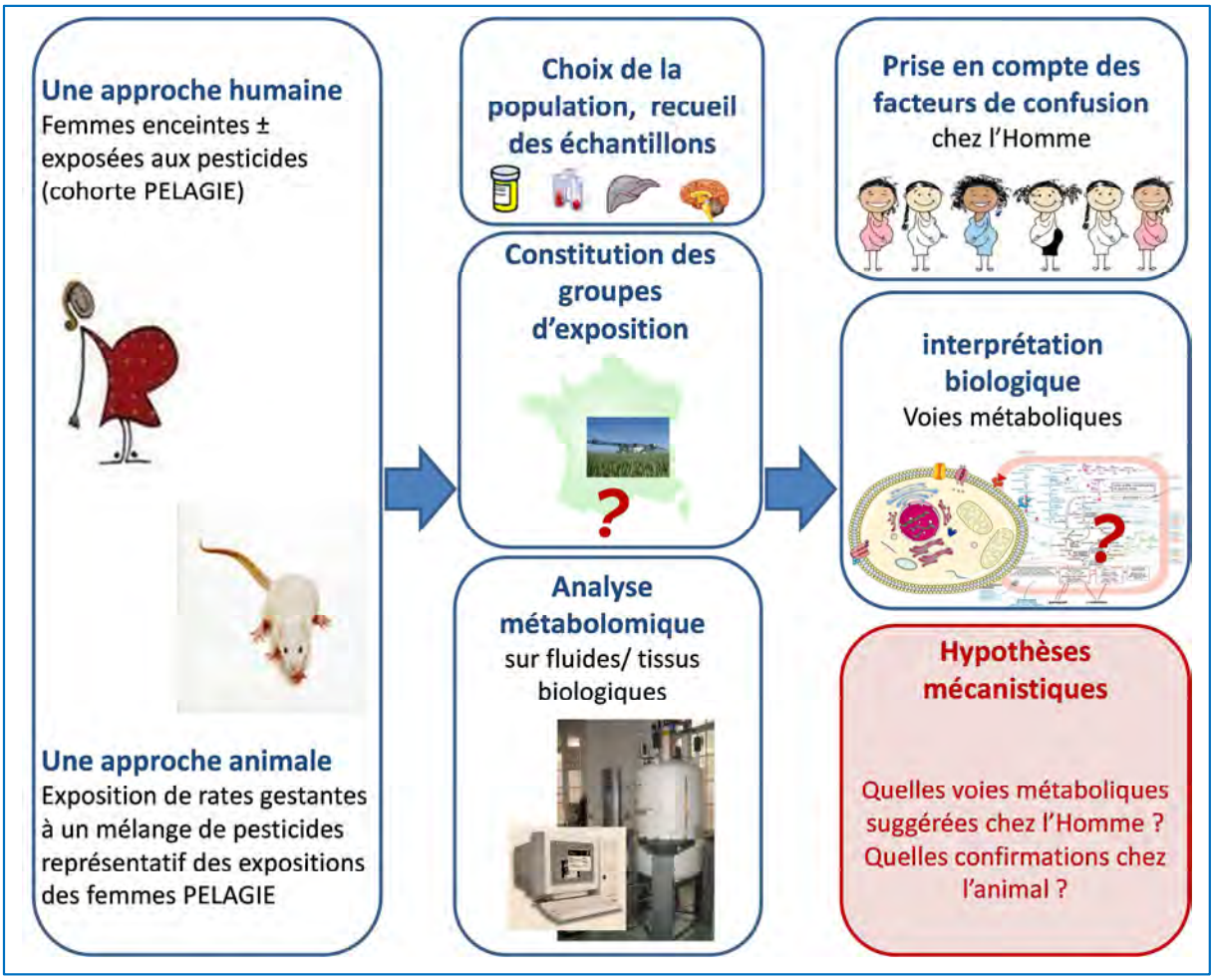


Figure 7 *: Stratégie générale de la thèse*

La stratégie d'étude chimiométrique, décrite dans la figure 8, comprend la préparation des échantillons, l'acquisition des spectres, le prétraitement des données, l'analyse statistique, l'identification des métabolites et l'interprétation biologique. L'acquisition spectrale et une partie du pré-traitement des données ont été réalisées par Cécile Canlet, INRA UMR 1331, Toulouse.

Une description détaillée de l'analyse métabolomique, similaire dans les approches épidémiologique et toxicologique, est détaillée en annexe 1.

Dans l'approche humaine, une étape complémentaire a été réalisée pour confirmer les relations observées entre les modifications métaboliques et les groupes d'exposition en prenant en compte les caractéristiques individuelles des femmes et des enfants qui peuvent avoir une influence sur le métabolisme (niveau d'éducation, âge, parité, IMC, consommation d'alcool et de tabac, âge gestationnel à la naissance, type d'accouchement…). Pour cela, des

régressions polytomiques[1] sur les données spectrales non filtrées ont été réalisées par Charline Warembourg, INSERM UMR 1085, Rennes. Le logiciel SAS a été utilisé (version 9.3, SAS Institute).

Les modifications des niveaux d'expression des métabolites en fonction des groupes nous donneront une indication sur les voies métaboliques qui peuvent avoir été touchées. Cela permettra de poser des hypothèses mécanistiques en lien avec l'exposition environnementale étudiée. Ces hypothèses seront posées par comparaison avec les données publiées dans la littérature.

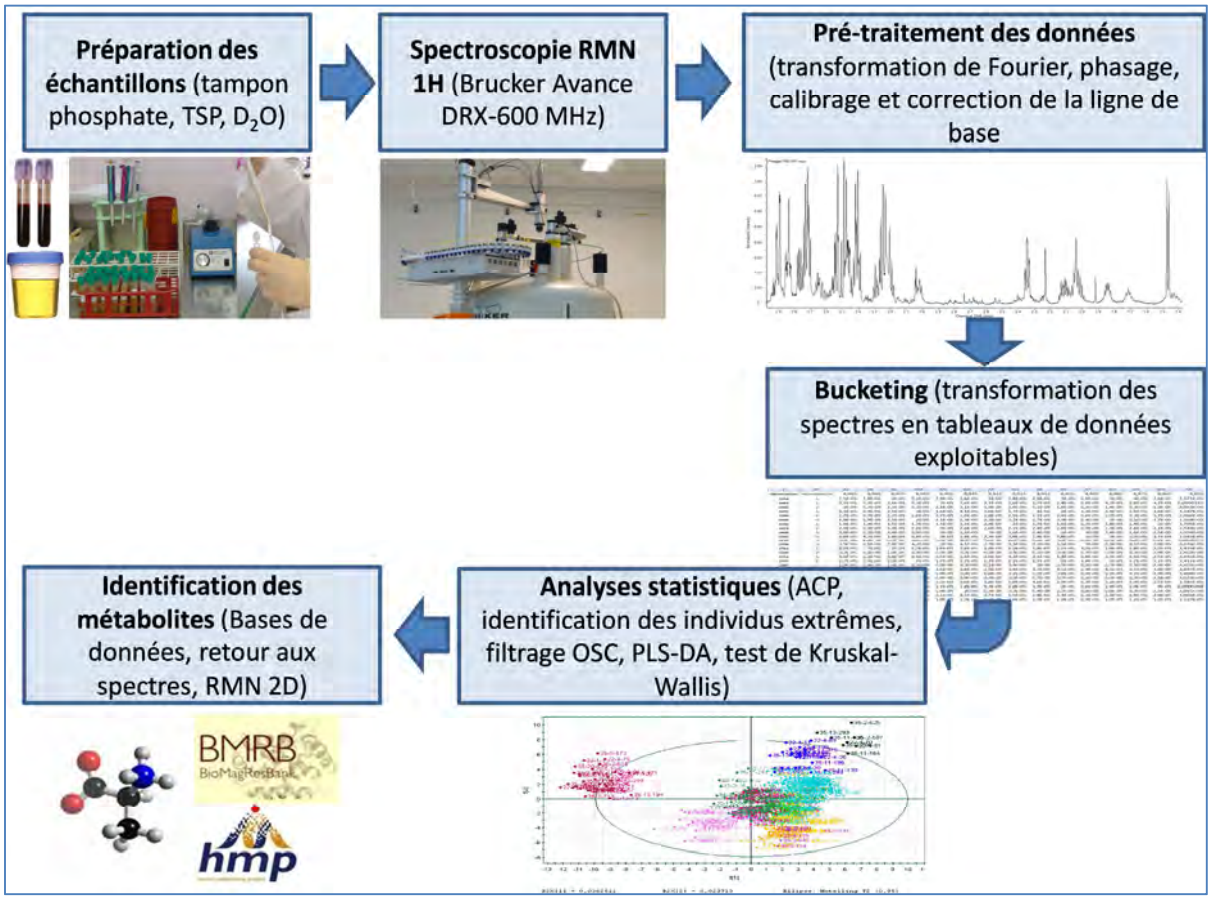


Figure 8 : Principales étapes dans l'analyse métabolomique

[1] La régression polytomique est l'équivalent de la régression logistique lorsque la variable à expliquer comporte plus de 2 modalités, ce qui est le cas des groupes d'expositions.

CHAPITRE 3 : APPROCHE EPIDEMIOLOGIQUE

1. Stratégie d'étude

Dans l'approche épidémiologique, la stratégie d'étude correspond à :

- L'identification d'une population de femmes enceintes exposées de manière environnementale aux pesticides ;
- La constitution de groupes d'exposition contrastée aux pesticides ;
- L'analyse chimiométrique (prise d'empreintes métaboliques sur les fluides biologiques des femmes et de leur enfant par RMN, description ACP, filtrage OSC et standardisation des données, modélisation PLS-DA) ;
- L'ajustement sur certaines caractéristiques personnelles des femmes (facteurs de confusion) ;
- L'identification des métabolites discriminants et la génération d'hypothèses mécanistiques.

2. Choix de la population d'intérêt

L'unité 1085 de l'INSERM conduit l'étude PELAGIE (Perturbateurs Endocriniens Etude Longitudinale sur les Anomalies de la Grossesse, l'Infertilité et l'Enfance) qui consiste, entre autre, à évaluer les conséquences d'expositions environnementales (pesticides, sous-produits de chloration, polluants organiques persistants…) ou professionnelles (solvants) et de la consommation de poisson sur le déroulement de la grossesse, son issue, le développement psychomoteur de l'enfant, sa croissance pondérale, la survenue d'asthme ou d'allergies (Guldner *et al.* 2007 ; Garlantezec *et al.* 2009 ; Petit *et al.* 2010 ; Chevrier *et al.* 2011 ; Cordier *et al.* 2012 ; Pelé *et al.* 2013). Cette étude est menée au moyen d'une cohorte prospective mère - enfants de 3 421 femmes ayant accouché en Ille et Vilaine, Côtes d'Armor ou Finistère, entre avril 2002 et février 2005.

Les femmes ont été incluses dans la cohorte avant 19 semaines d'aménorrhée. Un suivi de la grossesse et des enfants après la naissance est effectué à partir du recueil de différentes informations, par le biais de questionnaires transmis à la mère lors de l'inclusion et aux 2 ans de l'enfant, des dossiers médicaux à la maternité, d'un recueil d'échantillons biologiques et d'un examen de l'enfant (examen clinique à la naissance et tests neuropsychologiques à 6

ans sur des échantillons aléatoires de la cohorte entière). Les échantillons biologiques recueillis comprennent :

- Un prélèvement des urines du matin au moment de l'inclusion : les femmes devaient, au lever, uriner dans un flacon comprenant une goutte d'acide nitrique afin d'obtenir une concentration théorique de 1 mM. L'acide ajouté a servi à préserver l'échantillon de la dégradation microbienne pendant le transport. Les flacons ont été retournés à l'INSERM par la poste. Les urines recueillies correspondent donc théoriquement aux premières urines du matin. A réception, 10 mL ont été congelés puis conservés à -20°C jusqu'à l'analyse ;
- Un prélèvement de sang de cordon (et également de placenta et de cheveux de la mère) au moment de l'accouchement : le sang de cordon a été prélevé à l'aide d'une seringue. Après centrifugation, le sérum a été aliquoté dans des tubes eppendorf ou cryo conservés à -20°C jusqu'à l'analyse.

Parmi ces 3 421 femmes, 338 femmes ont été choisies en fonction de critères permettant de réaliser des analyses métabolomiques sur les échantillons de fluides biologiques recueillis (urines de la femme et sang du cordon). Ces critères sont les suivants :

- Naissances vivantes et uniques (n = 3 322) ;
- Disponibilité des échantillons de fluides biologiques provenant à la fois de la mère (urine) et de l'enfant (sang de cordon) pour chaque couple mère - enfant (n = 1 061). Ce nombre plus restreint par rapport au nombre de femmes de la cohorte est expliqué par l'utilisation des fluides biologiques pour d'autres projets (Cordier *et al.* 2012 ; Garlantézec *et al*. 2013 ; Chevrier *et al.* 2013, 2014) ;
- Inclusion en 2004 (taux d'inclusion le plus élevé de 36 %), conduisant à la congélation des échantillons depuis 2004. Ce critère permet d'éviter la variabilité inter-échantillons pouvant être liée à la durée de conservation, bien que la plupart des études ayant recherché les effets de la congélation sur le métabolome urinaire ou plasmatique concluent que la variabilité interindividuelle est plus importante que la variabilité liée à la conservation des échantillons[2]

[2] Dunn et al. ont montré que la variance et les pics observés sur un échantillon conservé 30 minutes à 4 °C puis congelé à – 80°C étaient similaires à ceux d'un échantillon conservé 24 h avant d'être congelé (Dunn et al. 2008). D'autres auteurs ont montré que les échantillons de sang, de sérum et d'urine pouvaient être conservés

(Beckonert *et al.* 2007 ; Deprez *et al.* 2002 ; Dunn *et al.* 2008 ; Maher *et al.* 2007) (n = 338).

La population d'étude correspond donc à 338 femmes enceintes incluses en 2004. Le tableau 3 donne une description détaillée de cette population.

Les femmes proviennent pour moitié d'Ille et Vilaine et pour moitié des Côtes d'Armor, le département du Finistère n'étant que très peu représenté. La majorité réside dans des communes inférieures à 20 000 habitants (> 80 %), sont âgées de 25 à 34 ans (76 %) et n'ont pas fumé (71 %) ni bu d'alcool (84 %) pendant la grossesse. On peut également noter que plus de la moitié de ces femmes ont fait des études supérieures. Les issues défavorables de grossesse (prématurité, retard de croissance intra-utérin, malformations congénitales) ne sont pas représentées dans ce sous-échantillon de la cohorte PELAGIE, car les échantillons biologiques ont déjà été consommés pour les analyses cas-témoins nichées dans la cohorte. Ces 338 femmes sont néanmoins représentatives des femmes incluses en 2004 et ayant eu une issue de grossesse normale (n = 1 042), excepté pour le département de résidence : les femmes résidant en Côtes d'Armor sont plus nombreuses dans notre échantillon, et le Finistère est très peu représenté (p < 0,0001) (la comparaison est présentée en annexe 2).

de 3 mois jusqu'à 9 mois à – 80°C pour les premiers, – 40°C pour les seconds, sans différences significatives (Beckonert et al. 2007;Deprez et al. 2002;Maher et al. 2007). Néanmoins, aucune étude ne s'est intéressée à l'effet d'une très longue conservation (plusieurs années) sur le métabolome. De plus, une étude a mis en évidence que la distribution de certaines lipoprotéines plasmatiques était modifiée après conservation du plasma pendant 2 semaines à – 20°C (Cohn et al. 2004).

Tableau 3 : Description de la population des 338 femmes enceintes incluses en 2004 pour lesquelles un échantillon d'urine et de sang de cordon étaient disponibles

Département de résidence		
Ille et Vilaine (35)	n=168	49,7 %
Côtes d'Armor (22)	n=163	48,2 %
Finistère (29)	n=7	2,1 %
Zone d'habitation		
Commune < 20 000 habitants	n=289	85,5 %
Commune > 20 000 habitants	n=49	14,5 %
Age de la femme à l'inclusion		
< 25 ans	n=31	9,2 %
25 – 29 ans	n=141	41,7 %
30 – 34 ans	n=116	34,3 %
> 35 ans	n=50	14,8 %
Age médian (min – max)	30,2 ans	(17,2 – 43,7)
Indice de masse corporelle (IMC) médian (min – max)	22,8	(16 – 40,7)
Niveau d'études		
Inférieur au baccalauréat	n=59	17,5 %
Baccalauréat	n=76	22,5 %
Etudes supérieures	n=202	59,8 %
Statut tabagique à l'inclusion		
Non fumeuse ou ex-fumeuse	n=241	71,3 %
Ayant arrêté au moment de la conception	n=43	12,7 %
Fumeuse	n=52	15,4 %
Consommation d'alcool à l'inclusion		
Pas d'alcool pendant la grossesse	n=284	84 %
Occasionnellement	n=47	14 %
Au moins 1 verre/ jour	n=6	1,8 %

3. Choix des groupes d'exposition contrastée

Aujourd'hui, il n'existe pas de banque de données globale rassemblant les connaissances sur le métabolome complet de tous les organismes vivants. Par ailleurs, une grande partie des métabolites et des intermédiaires du métabolisme n'a pas encore été identifiée. Aucune population de référence ne peut donc être définie. Il apparaît donc nécessaire de classer les femmes enceintes dans des groupes d'exposition environnementale contrastée aux pesticides, et de disposer d'au moins 3 groupes afin de pouvoir étudier l'influence de cette exposition à partir d'une relation dose-réponse.

Pour cela, les résultats préliminaires de la cohorte PELAGIE sont utilisés : des groupes d'exposition contrastée sont identifiés à partir de la présence et du pourcentage de cultures agricoles dans la commune de résidence des femmes enceintes. Cet indicateur indirect qui reflète l'usage des pesticides à proximité des résidences des femmes, est souvent utilisé en épidémiologie pour étudier les associations entre expositions aux pesticides et issues de grossesse (petit poids de naissance (Xiang *et al.* 2000b), mort fœtale (Bell *et al.* 2001), malformations (Meyer *et al.* 2006) ou encore cancer de l'enfant (Reynolds *et al.* 2002)). Bien que cet indicateur comporte des limites pour caractériser l'exposition environnementale, plusieurs études ont montré des corrélations entre la proximité des activités agricoles ou des cultures et les expositions aux pesticides (voir chapitre **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Il est donc raisonnable de considérer que le pourcentage de cultures dans la commune de résidence des femmes peut être un indicateur indirect de l'exposition environnementale aux pesticides.

Nous nous intéressons d'abord aux expositions environnementales pour lesquelles des associations ont été observées avec les issues de grossesse « restrictions de croissance intra-utérine » et « petit périmètre crânien »[3] dans la cohorte PELAGIE (Petit *et al.* 2010). Celles-ci ont été estimées à partir de la part de culture de céréales dans la surface agricole utile de la commune de résidence des femmes. Les cultures de céréales sont fréquentes et s'étendent de 0 à 67 % de la surface utile agricole. Trois groupes d'exposition ont été proposés sur cette base, correspondant respectivement aux 1er, 2ème et 3ème terciles de la distribution dans la cohorte entière, soit :

- 0 à 17 % de la surface utile agricole occupée par des céréales (n=159). Ce groupe inclut les femmes résidant dans les communes de plus de 20 000 habitants (absence de cultures) ;
- > 17 à 25 % de la surface utile agricole occupée par des céréales (n=95) ;
- plus de 25 % de la surface utile agricole occupée par des céréales (n=84).

[3] Les restrictions de croissance intra-utérine ont été définies dans la cohorte Pélagie selon le modèle proposé par Mamelle (Mamelle et al. 2001). Elles dépendent du poids et du sexe de l'enfant, des paramètres morphologiques de la mère (taille, poids), de son âge et de l'âge gestationnel. Le petit périmètre crânien a été défini selon le 5ème percentile des courbes de référence AUDIPOG de Mamelle (Mamelle et al. 1996a;Mamelle et al. 1996b).

4. Analyse de la variabilité humaine dans l'échantillon

Notre échantillon initial portait sur 338 femmes pour lesquelles l'urine a été recueillie au cours du premier trimestre de la grossesse. Dans le cadre de notre projet, certaines analyses menées sur les profils métaboliques des femmes enceintes ont mis en évidence deux caractéristiques physiologiques engendrant une variabilité observable sur le profil métabolique urinaire. La première concerne l'âge gestationnel au moment du recueil urinaire (qui a été réalisé entre la 3ème et la 16ème semaine de grossesse). La seconde concerne l'IMC des femmes.

4.1. Variabilité du profil urinaire liée à l'âge gestationnel

Le recueil urinaire des 338 femmes enceintes issues de la cohorte PELAGIE a été réalisé au moment de l'inclusion des femmes dans la cohorte, qui s'est étendue de 3 à 16 semaines de grossesse (médiane [Q1 ; Q3] = 10,4 semaines [8,14 ; 11,4]).

La composition urinaire et sanguine, en métabolites et protéines (acide urique, créatinine, albumine, aminotransférases, bilirubine, triglycérides, etc.), varie au cours de la grossesse et cela peut donc engendrer une variabilité dans les profils urinaires. Peu d'éléments sont disponibles dans la littérature pour confirmer cette hypothèse sur les premières semaines de la grossesse car la plupart des protocoles proposés comparent soit les deux derniers trimestres (à partir de la semaine 14 ou 18) (De Flamingh and Van der Merwe 1984 ; Nava *et al.* 1996), soit, dans de rares cas, le premier trimestre aux autres (Larsson *et al.* 2008). De plus, une équipe qui étudie les modifications métaboliques liées aux malformations fœtales n'a pas mis en évidence de tendance liée à l'âge gestationnel (comparaison des âges gestationnels inférieurs ou supérieurs à 20 semaines ou 15-16, 17-20 et 21-24 semaines) ou à l'âge de la femme enceinte (comparaison des femmes de 25-30, 31-37 et 38-42 ans), aussi bien dans le liquide amniotique, les urines que le plasma maternel (Diaz *et al.* 2011 ; Graça *et al.* 2009). Nous avons donc étudié l'influence de l'âge gestationnel sur le profil métabolique urinaire des 338 femmes enceintes de la cohorte PELAGIE.

La méthode employée est celle décrite en annexe 1. Les semaines 3 et 16 ont été supprimées des analyses en raison de leur faible effectif (seulement 2 observations dans

chacune de ces semaines). Les données ont été filtrées par la méthode OSC et la standardisation unité a ensuite été appliquée aux données. Un modèle de PLS-DA à 11 composantes expliquant 63,8 % de la variabilité et avec une capacité prédictive Q2 de 0,366 a été construit. La figure 9 présente la projection des observations dans le 1er plan PLS (carte factorielle du poids des individus, ou « score plot »). Chaque couleur correspond à une semaine de grossesse. On remarque sur ce graphe que les observations ont tendance à se regrouper par semaine de grossesse. L'axe 1 oppose les semaines 5, 7, 8, 9, 12, 13, 14 et 15 (abscisses < 0) aux semaines 4, 6, 10 et 11 (abscisses > 0). L'axe 2 sépare plutôt les semaines 4, 5, 6,8, 11, 12 aux semaines 9, 10, 13, 14, 15. L'analyse plus précise des métabolites potentiellement significativement modifiés révèle une difficulté d'exploitation en raison d'une variation importante des métabolites d'une semaine à l'autre. Prise dans sa globalité, l'analyse montre néanmoins des modifications entre certaines semaines d'acide hippurique, de créatinine, créatine, taurine, acide citrique, alanine, 2-oxoglutarate, glycine, ou encore acide acétique. Cette constatation justifie le choix de ne retenir qu'une semaine de grossesse pour la suite des analyses, afin de réduire au mieux la variabilité inhérente à ce recueil d'urine.

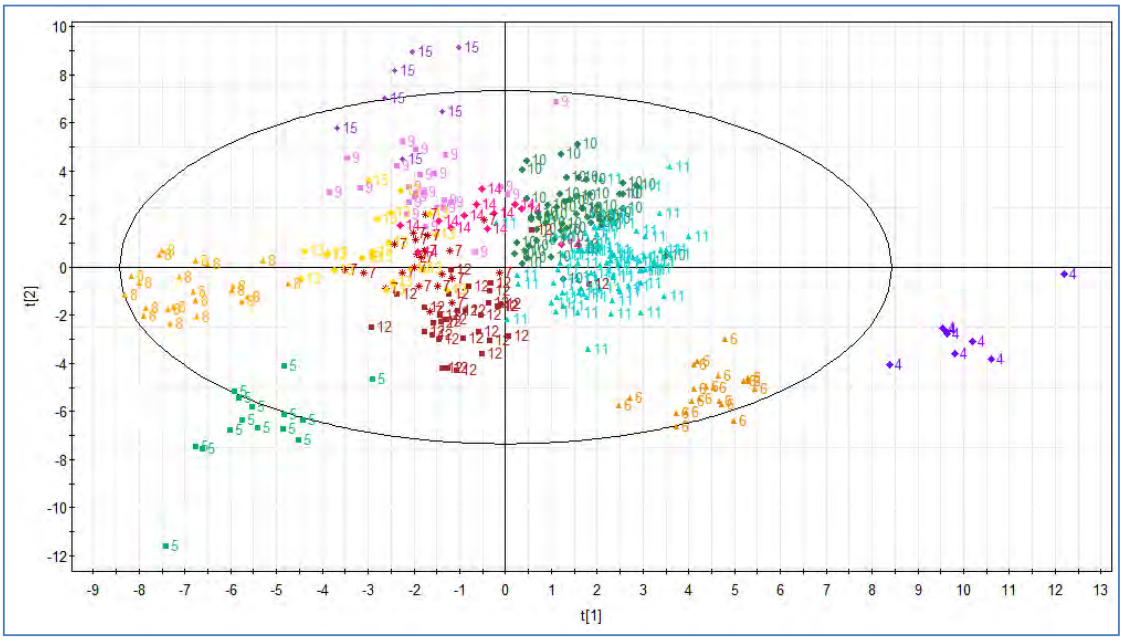


Figure 9 : Projection des observations (variables "semaine") dans le 1er plan obtenu à partir d'un modèle de PLS-DA appliqué aux données filtrées et standardisées (Pareto). Le modèle est construit à partir des profils métaboliques RMN urinaires des 334 femmes enceintes éligibles. 9 composantes principales. N=321, R2=57,1 %, Q2=0,354. Chaque couleur correspond à une semaine de grossesse (de 4 à 16)

4.2. Variabilité du profil urinaire liée à l'indice de masse corporelle

Si l'effet de l'obésité sur les issues de grossesse est connu (augmentation du poids de naissance, risque plus élevé de développer une obésité à l'âge adulte, et donc des pathologies métaboliques ou cardiovasculaires), peu de connaissances ont été générées sur les mécanismes en cause. Ainsi, sur la base de la même méthode décrite précédemment, l'effet du surpoids et de l'obésité sur le profil métabolique urinaire des femmes enceintes et sur le profil métabolique du sérum préparé à partir du sang de cordon à la naissance a été étudié. Ce travail a été confié à un stagiaire de master 2. Parmi les 338 femmes éligibles, celles avec un IMC non renseigné ou inférieur à 18,5 ont été exclues (n = 15). Les femmes ont ensuite été classées en 3 groupes en fonction de la valeur de leur IMC. Le premier groupe correspondait aux femmes de poids normal (IMC compris entre 18,5 et < 25, n = 256), le second aux femmes en surpoids (IMC compris entre 25 et < 30, n = 46) et le troisième aux femmes obèses ayant un IMC supérieur ou égal à 30 (n = 19). Les femmes obèses, et dans une moindre mesure, les femmes en surpoids, ont été discriminées à partir d'un modèle de PLS-DA à deux composantes principales. Le score plot est présenté dans la figure 10.

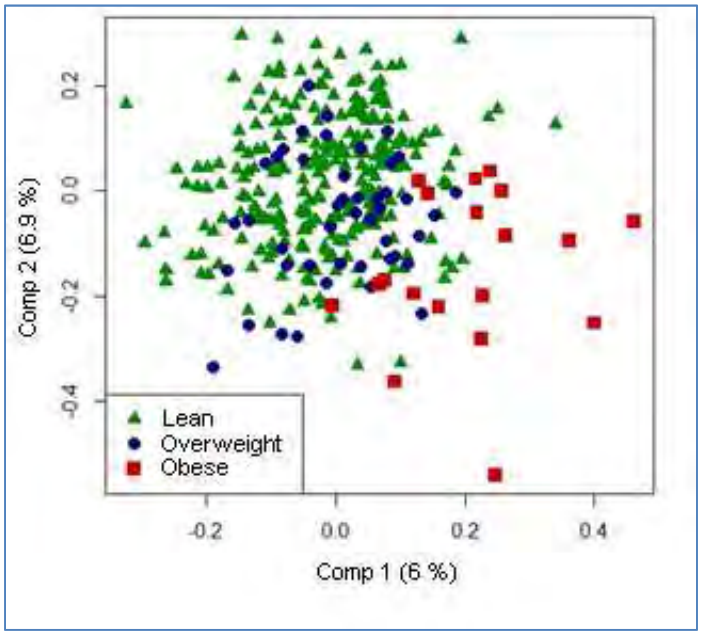


Figure 10 : Projections des observations (variable "IMC") dans le 1er plan obtenu à partir d'un modèle de PLS-DA appliqué aux données standardisées (Pareto). Le modèle est construit à partir des profils métaboliques RMN urinaires des 321 femmes enceintes éligibles pour l'analyse de l'IMC. Triangle vert : femmes normales ; losanges bleus : femmes en surpoids ; carrés rouges : femmes obèses

Après ajustement sur les facteurs de confusion, une diminution des concentrations urinaires d'hippurate et de phénylalanine associée à une augmentation de la créatinine chez les femmes en surpoids ou obèses comparée aux femmes de poids normal ont été mises en évidence. De plus, les concentrations urinaires de lactate, créatine, lysine, citrate et acétate étaient significativement plus élevées chez les femmes obèses, comparativement aux autres femmes. Certaines de ces modifications (acétate, hippurate, et lactate urinaire) pourraient être expliquées par une perturbation de la flore intestinale, qui est connue pour jouer un rôle dans les mécanismes de l'obésité (Dewulf *et al.* 2013 ; Waldram *et al.* 2009). A noter que ces analyses n'ont pas mis en évidence de modifications significatives dans le profil métabolique sanguin des enfants à la naissance en lien avec l'IMC de la mère. Ces résultats font l'objet d'un article en cours de préparation (annexe 5).

5. Utilisation des profils métaboliques urinaires pour décrire des groupes d'expositions aux pesticides chez la femme enceinte en Bretagne

La méthode est fondée sur la population sélectionnée préalablement, mais restreinte à 83 femmes pour lesquelles les urines ont été recueillies la même semaine (11ème semaine de grossesse, n = 86) et pour lesquelles les profils urinaires n'ont pas révélé d'anomalie (exclusion de 3 individus). Les 83 femmes ont été classées selon les 3 groupes d'exposition décrits préalablement, selon le pourcentage de surface cultivées en céréales dans la commune de résidence. Des modélisations PLS-DA ont été réalisées après filtrage OSC pour exploiter les données issues des spectres RMN des urines. Des régressions polytomiques ont été utilisées pour ajuster les résultats sur les facteurs de confusion pour lesquels une significativité a été observée au test du rapport de vraisemblance (âge, tabagisme, parité, IMC).

Les résultats ont montré que les 3 groupes d'exposition étaient correctement séparés après un modèle de PLS-DA sur les données filtrées (standardisation de pareto, R2 = 90,7 % et Q2 = 0,53). Après ajustement sur les facteurs de confusion, les principales modifications significatives ont été observées pour la glycine, la thréonine, la glycérophosphocholine et le lactate urinaires (augmentation) et pour le citrate (diminution à la limite de la significativité). Ces résultats suggèrent que l'exposition aux pesticides pourrait conduire à des modifications métaboliques urinaires chez la femme enceinte et que ces modifications pourraient provenir d'un stress oxydant et d'une altération du métabolisme énergétique.

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS ONE

Metabolomics Tools for Describing Complex Pesticide Exposure in Pregnant Women in Brittany (France)

Nathalie Bonvallot[1,2,3]*, Marie Tremblay-Franco[3], Cécile Chevrier[4,5], Cécile Canlet[3], Charline Warembourg[4,5], Jean-Pierre Cravedi[3], Sylvaine Cordier[4,5]

1 National Institute of Health and Medical Research (INSERM) UMR 1085 IRSET (Research Institute for Environmental and Occupational Health), Rennes, France, **2** EHESP-School of Public Health Rennes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France, **3** National Institute for Agricultural Research (INRA) UMR 1331 Toxalim (Research Center in Food Toxicology), University of Toulouse, INP, ENVT, EIP, UPS, UMR1331, Toulouse, France, **4** INSERM UMR 1085 IRSET, Rennes, France, **5** University of Rennes I, Rennes, France

Abstract

Background: The use of pesticides and the related environmental contaminations can lead to human exposure to various molecules. In early-life, such exposures could be responsible for adverse developmental effects. However, human health risks associated with exposure to complex mixtures are currently under-explored.

Objective: This project aims at answering the following questions: What is the influence of exposures to multiple pesticides on the metabolome? What mechanistic pathways could be involved in the metabolic changes observed?

Methods: Based on the PELAGIE cohort (Brittany, France), 83 pregnant women who provided a urine sample in early pregnancy, were classified in 3 groups according to the surface of land dedicated to agricultural cereal activities in their town of residence. Nuclear magnetic resonance-based metabolomics analyses were performed on urine samples. Partial Least Squares Regression-Discriminant Analysis (PLS-DA) and polytomous regressions were used to separate the urinary metabolic profiles from the 3 exposure groups after adjusting for potential confounders.

Results: The 3 groups of exposure were correctly separated with a PLS-DA model after implementing an orthogonal signal correction with pareto standardizations (R2 = 90.7% and Q2 = 0.53). After adjusting for maternal age, parity, body mass index and smoking habits, the most statistically significant changes were observed for glycine, threonine, lactate and glycerophosphocholine (upward trend), and for citrate (downward trend).

Conclusion: This work suggests that an exposure to complex pesticide mixtures induces modifications of metabolic fingerprints. It can be hypothesized from identified discriminating metabolites that the pesticide mixtures could increase oxidative stress and disturb energy metabolism.

Citation: Bonvallot N, Tremblay-Franco M, Chevrier C, Canlet C, Warembourg C, et al. (2013) Metabolomics Tools for Describing Complex Pesticide Exposure in Pregnant Women in Brittany (France). PLoS ONE 8(5): e64433. doi:10.1371/journal.pone.0064433

Editor: Daniel S. Sem, Concordia University Wisconsin, United States of America

Received December 20, 2012; **Accepted** April 15, 2013; **Published** May 21, 2013

Copyright: © 2013 Bonvallot et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the EHESP-School of Public Health (Young researchers, www.ehesp.fr) and the French Ministry for Environment and sustainable development (Antiopes, INERIS, http://www.ineris.fr/dossiers-thematiques-ineris/509). The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: nathalie.bonvallot@ehesp.fr

Introduction

The use of pesticides can lead to environmental contaminations to various molecules in different environmental media. Several studies have shown that the proximity to agricultural pesticide applications may be a source of pesticide exposure in addition to domestic or dietary sources [1], [2], [3], [4], [5].

In Brittany, more than 60% of the surface area is devoted to agricultural activities, with a large part (50%) of cereal and corn crops. In this region in the 2000's, almost all land areas received at least four different treatments in order to control annual grasses (herbicides), fungus or insects proliferation (fungicides and insecticides). The main classes used in 2006 were chloroacetanilides, carbamates, morpholines, triazoles, organophosphorus, pyrethroids [6]. For some of these, the modes of action of poisoning in mammals, included human beings are well known: organophosphorus and carbamate insecticides are able to inhibit the acetylcholinesterase, leading to an overstimulation of postsynaptic cholinergic receptors [7]; pyrethroid insecticides can modify the kinetics of voltage-sensitive sodium channels, inducing a change in the nerve action potential [8]. These effects have been confirmed in the case of chronic occupational exposure with moderate levels [9]. Little is known in the case of environmental and low-doses exposure to complex pesticide mixtures in the general population and especially in fetuses and infants, who are considered particularly susceptible to toxicants because of the development of the organism until the puberty. Using biomonitoring tools to assess exposure, several recent studies have suggested potential impact of low-doses exposure to specific pesticide compounds (such organophosphorus insecticides) during pregnancy, on pregnancy outcomes [10], [11] and behavioral and neuropsychological outcomes [12], [13], [14], or triazine herbi-

cides on pregnancy outcomes [15]. Other studies have examined the impact of more complex mixtures on pregnancy outcomes, in using indicators of agricultural activities: In Brittany (France), Petit et al. showed an association between a small head circumference at birth and living in a municipality where peas were grown in early pregnancy [16]. In Colorado (U.S.A.), Xiang et al. suggested an association between low birth weight and total crop, corn crop and sugar beet crop production, using geographic information system in order to identify the proximity of maternal residence to agricultural areas [17]. Schreinemachers studied the rate of birth abnormalities in several U.S. states by comparing counties with a high percentage of wheat land's areas and those with a lower percentage. She showed significant increases in certain birth malformations (circulatory/respiratory and musculoskeletal/integumentary systems) in high wheat counties [18].

Currently, the identification of biomarkers of exposure, early effect and disease is of particular concern, with the development of new high-throughput technologies such as genomics, proteomics or metabolomics. Metabolomics consists in the study of the nature and quantity of all metabolites produced by an organism (including endogenous molecules involved in the growth and homeostasis of cells as well as by-products of external pollutants). It has come to be widely used in recent years to identify metabolic pathways modified by disease, drugs or toxic exposures, as reviewed by several authors [19], [20], [21]. Unlike genomics or proteomics, metabolomics provides extensive data about the phenotype and can be the last step in understanding the functioning of an organism. In theory, this approach might help to characterize biological disruptions caused by various stimuli and environmental factors and thus it could be an integrative tool to increase our understanding of the mode of action induced by pollutant exposures. The metabolic changes could be observed directly in biological fluids, making also possible the direct identification of biomarkers of complex and low-dose exposure or early effect in human population. However, in non-experimental studies the main challenge is to control the high number of factors affecting the metabolome, in addition to environmental exposures (lifestyle, diet, drugs…). To our knowledge, only two epidemiological studies have been interested in the modification in urinary and blood metabolic profiles associated with human environmental pollutant exposures. The first one concerned 51 male workers exposed to welding fumes in Taiwan. The study has shown an increase of metabolites involved in inflammatory and oxidative tissue injury processes, especially glycine, taurine and betaine [22]. The second one was interested in urinary metabolic profiles in 178 human volunteers living near a source of environmental cadmium pollution [23].

For the first time, the present study performed metabolomics analyses on urine of pregnant women with contrasted exposure to pesticide mixtures in order to identify discriminant metabolites between exposure groups. It is based on 2 hypotheses: the metabolome could be modified after an exposure to a toxicant [21] as well as to a low-dose mixture of toxicants; the change of a metabolic process could lead to a disturbance at the cell-scale, affecting possibly the functioning of the whole organism [24].

Materials and Methods

Population and sample collection

The INSERM (French National Institute of Health and Medical Research) ethics committee approved the study procedures. The population selected is issued from the PELAGIE cohort, which includes 3421 pregnant women in Brittany (France) enrolled from general population by gynecologists in early pregnancy between 2002 and 2006. Gynecologists informed them about the nature of the study and asked them to participate, after providing written consent. This consent was accompanied by a letter of information describing the goal of the study, the consortium, data collection procedures, follow-up after birth through mailed questionnaires or health examinations. Reference (N°902076; 31 may 2002) to the approval of the National Commission in charge of Data Protection (CNIL) was also indicated. The right to refuse participation and the fact that this refusal would not have any consequence on the relation with her physician was explicitly mentioned. The objective of the PELAGIE study is to assess the consequences of environmental exposures (solvents, persistent organic pollutants, pesticides…) on the pregnancy, birth outcomes and psychomotor development in infant. A detailed description of this cohort is made elsewhere [15]. At her inclusion during the first trimester of the pregnancy (4^{th} to 15^{th} week), each woman had to return a first morning void urine sample that she collected and transferred into two vials containing nitric acid to avoid bacterial degradation. Samples were mailed to the study laboratory in a pre-stamped package at ambient temperature, with routine delivery taking from 1 to 3 days. Upon receipt, the 10 mL samples were frozen and stored at $-20°C$. In the same time, data on social and demographic characteristics, diet and lifestyle were retrieved by questionnaire. At birth, medical data on health outcomes were obtained.

For this exploratory study, pregnant women were selected according to 4 criteria as shown in the figure 1. A special attention has been paid to the comparability of the data: the same year of inclusion was selected for all the women to consider a similar likelihood of pesticide exposure according to the agricultural use, and to avoid the potential variability induced by different duration of storage of biological samples [25], [26]. The year 2004 was selected because it corresponds to the higher percentage of inclusion (36%). Finally, only urinary samples from the same gestational age were selected to decrease the variability according to stage of pregnancy suggested in the pilot study (data not shown). Samples were therefore restricted to the 11^{th} week of gestation, corresponding to the highest proportion of subjects (almost 26%, i.e. 86 women).

Identification of exposure groups

We define groups of exposure according to the surface of land dedicated to agricultural crops in the town of residence of the pregnant woman. Data on agricultural activities were collected from the National General Agricultural Census (RGA) between 2002 and 2006. It provides the percentage of area of the municipality used for agricultural activities according to crop, including corn, wheat, colza, peas, potatoes, and fresh vegetables (plus strawberries and melons). These data were matched with the mother's municipalities of residence in early pregnancy. Because cereal crops are widespread in the study region, we classified the pregnant women in 3 groups according to the percentage of the surface of land dedicated to cereal crops in their town of residence in early pregnancy (First, second and third tercile, corresponding to 0–17%, between >17 and 25% and above 25%). Presence of other crops in the municipalities has been associated with presence of cereals, especially peas crop which has been associated with higher risk of small head circumference according to a previous study [16].

Metabolomics analyses

Sample preparation. After thawing at room temperature and vortexing, 500 µL of urine were mixed with 200 µL of phosphate buffer (pH 7.39) prepared in D_2O in which was added

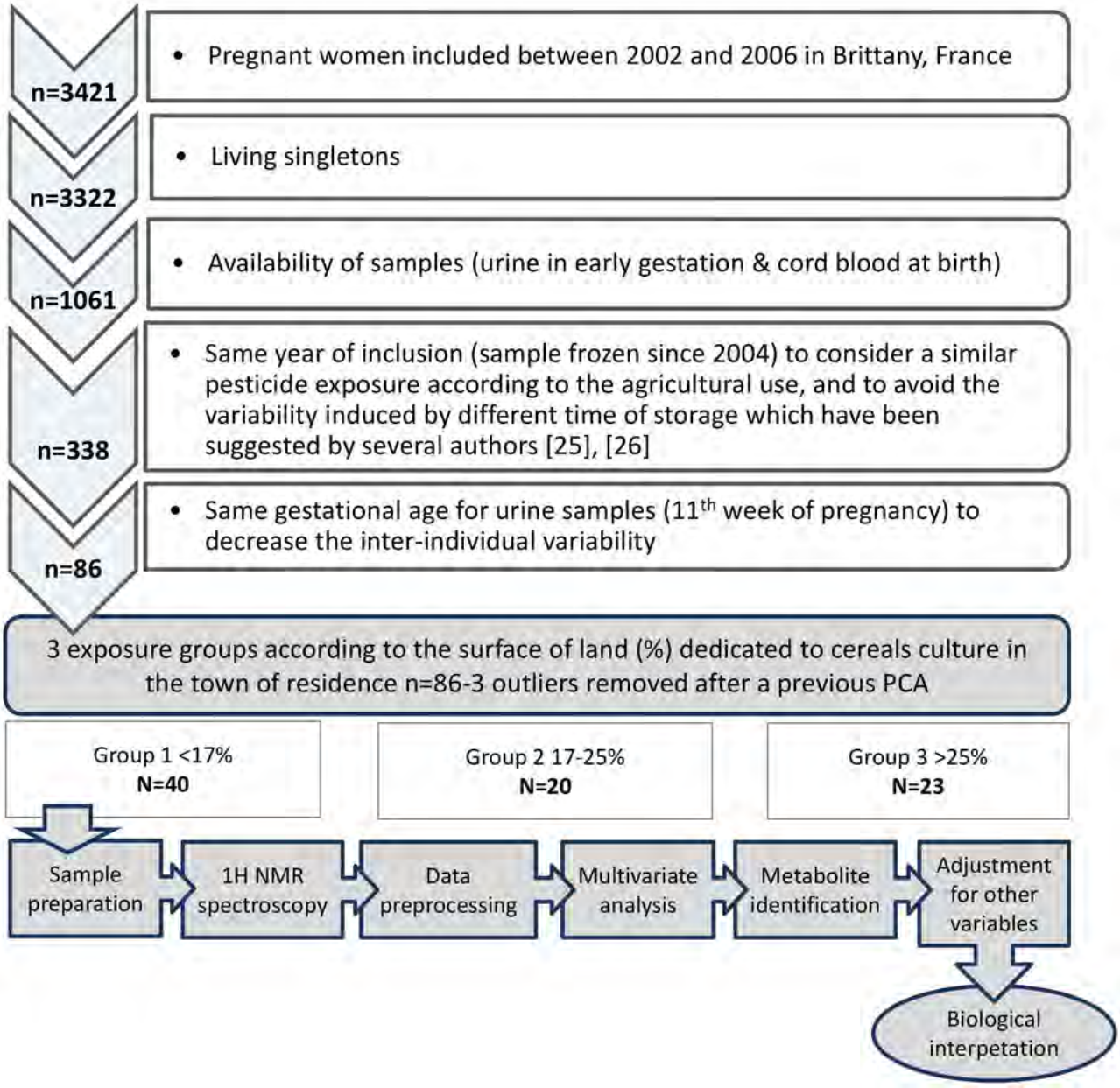


Figure 1. Flowchart of the metabolomics analysis.
doi:10.1371/journal.pone.0064433.g001

sodium 3-trimethylsilyl-1-[2,2,3,3,-$^{2}H_4$]-propionate (TSP, 1 mM). The phosphate buffer is used to minimize variations in chemical shift values in the acquired NMR spectra due to pH differences. TSP served as a chemical shift reference and D_2O served as a field-frequency lock for the NMR spectrometer. Each sample was vortexed and centrifuged for 10 min at 8,000 rpm to remove any precipitate. Then, 600 µL aliquots were transferred to standard 5 mm - NMR tubes (Norell ST 500, Landisville, NJ) for analysis.

Spectra acquisition and metabolite identification. NMR spectra of urine samples were acquired at 300 K on a Bruker Avance DRX-600 operating at 600.13 MHz (Bruker Biospin, Germany) and equipped with an autosampler and an inverse ^{1}H-^{13}C-^{15}N cryoprobe. One-dimensional ^{1}H NMR spectra were acquired using a standard pulse sequence NOESY to suppress residual water resonance. A relaxation delay of 2 s and mixing time of 150 ms were used. 128 free induction decays (FIDs) were collected into 32 k data points using a spectral width of 20 ppm with an acquisition time of 3.36 s, giving a total acquisition time of 7.10 s. 2D homonuclear ^{1}H-^{1}H COSY (correlation spectroscopy) and 2D heteronuclear ^{1}H-^{13}C HSQC (heteronuclear single quantum coherence spectroscopy) NMR spectra were also acquired for selected samples as an aid to spectral assignment, which was based on matching 1D and 2D data to reference spectra in a home-made reference database, as well as with other databases (http://www.bmrb.wisc.edu/metabolomics/; http://www.hmdb.ca/), and reports in literature.

^{1}H NMR data preprocessing. All free induction decays were then multiplied by an exponential function with a line broadening factor of 0.3 Hz prior to Fourier transformation. All spectra were referenced to the chemical shift of TSP (δ 0.00). All

NMR spectra were phase- and baseline-corrected manually using Topspin (V2.1, Bruker Biospin, Germany). The spectral region containing residual water and urea resonances (δ 4.515–6.495) was removed and spectra were digitized to 751 buckets corresponding to 0.01 ppm intervals across the chemical shift range δ 0.505–9.995 using the AMIX software package (V3.9.11, Bruker Biospin, Germany). Each integrated region was divided by the total spectral intensity in order to normalize values. This partially removes concentration differences between urine samples.

Discriminant analysis on urinary metabolites according to exposure groups. The NMR spectral data were imported into the SIMCA-P+ software package (version 12.0, Umetrics) for multivariate statistical analysis. A preliminary PCA (principal component analysis) was made to remove outliers (n = 3) among the 86 eligible women according to the 4 criteria mentioned above. Additionally, we used orthogonal signal correction (OSC) filtering in order to decrease variability in X-matrix (spectral data) not correlated with the Y-matrix (exposure groups) [27], [28], that is confounding factors such as physiological, experimental, and instrumental factors. Then, filtered data were Pareto-scaled. PLS-DA method was applied to filtered and Pareto scaled data. In PLS-DA, linear combinations of NMR buckets are constructed by maximizing covariance between the Y and X matrices. Then observations are projected onto a few of these linear combinations. Cross-validation was used to determine the number of linear combinations to be included in the PLS-DA model. The quality of the model was given by the two parameters R2Y (proportion of explained variance) and Q2Y (predictive ability). Q2 value was evaluated using a 7-fold cross-validation. A permutation test (200 iterations) was conducted for each PLS-DA model to test for validity. The spectral regions (buckets) with variable importance in the projection (VIP) above 2 were selected in this study. A non-

Table 1. Characteristics of the 83 pregnant women included in the metabolomic study by group of exposure[a].

	Total	By group of exposure			
		Group 0	Group 1	Group 2	
	(n = 83)	(n = 40)	(n = 20)	(n = 23)	p-value
Characteristics	**No. (%)**	**No. (%)**	**No. (%)**	**No. (%)**	
Educational Level					0.68[b]
Middle/high school	12 (14.5)	8 (20.0)	2 (10.0)	2 (8.7)	
Baccalaureate degree	22 (26.5)	9 (22.5)	7 (35.0)	6 (26.1)	
Post-secondary	49 (59.0)	23 (57.5)	11 (55.0)	15 (65.2)	
Age					0.17[b]
<25 years	7 (8.4)	3 (7.5)	3 (15.0)	1 (4.4)	
25–30 years	39 (47.0)	14 (35.0)	9 (45.0)	16 (69.6)	
30–35 years	27 (32.5)	15 (37.5)	7 (35.0)	5 (21.7)	
>35 years	10 (12.0)	8 (20.0)	1 (5.0)	1 (4.4)	
Median [Q1; Q3]	29.3 [27.0; 32.6]	31.5 [26.9; 33.7]	27.8 [26.9; 31.8]	29.1 [27.3; 31.1]	0.15[c]
Body Mass Index					0.50[b]
≤25 kg/m^2	67 (80.7)	30 (76.9)	18 (90.0)	19 (82.6)	
>25 kg/m^2	15 (19.3)	9 (23.1)	2 (10.0)	4 (17.4)	
Missing	*1*	*1*			
Median [Q1; Q3]	21.4 [20.2; 23.8]	21.3 [20.5; 24.7]	21.0 [19.7; 22.2]	21.9 [20.1; 28.3]	0.30[c]
Parity (including the child to be born)					0.01[b]
1	29 (34.9)	17 (42.5)	9 (45.0)	3 (13.0)	
2	36 (43.4)	11 (27.5)	9 (45.0)	16 (69.6)	
>2	18 (21.7)	12 (30.0)	2 (10.0)	4 (17.4)	
Smoking					0.10[b]
No smoking or ex-smoker	59 (71.1)	30 (76.9)	12 (60.0)	17 (73.9)	
Stop smoking in early pregnancy	13 (15.7)	2 (5.1)	5 (25.0)	5 (21.7)	
Smoking	10 (12.0)	7 (18.0)	3 (15.0)	1 (4.4)	
Missing	*1*	*1*			
Alcohol consumption					0.84[b]
No alcohol during pregnancy	71 (85.5)	34 (87.2)	18 (90.0)	19 (82.6)	
Occasionally or one glass a day	11 (13.3)	5 (12.8)	2 (10.0)	4 (17.4)	
Missing	*1*	*1*			

[a]Three groups according to the percentage of the surface of land dedicated to cereal crops in the town of residence in early pregnancy: group 0: 0–17%, group 1: >17–25% and group 2: >25%.
[b]p-value of a Fisher exact test.
[c]p-value of a Kruskal-Wallis test.
doi:10.1371/journal.pone.0064433.t001

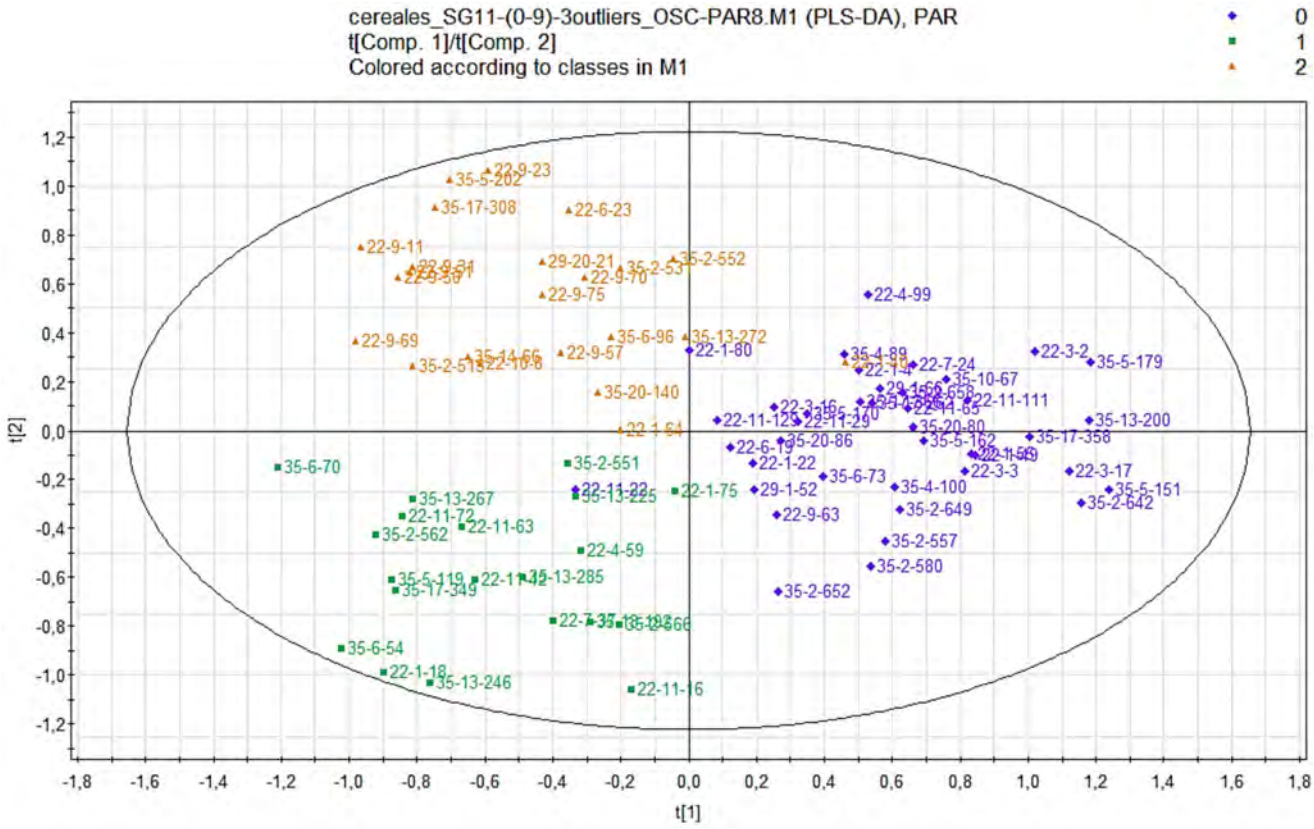


Figure 2. PLS-DA score plot from the ^{1}H NMR urinary metabolic profiles from 83 pregnant women. The score plot is the projection of the observations onto the first two latent variables. The PLS-DA model, constructed on OSC-filtered and Pareto-scaled data, includes 4 latent variables (N = 83; R2 = 90.7% and Q2 = 0.53). Three groups according to the percentage of the surface of land dedicated to cereal crops in the town of residence in early pregnancy: purple: group 0: 0–17%, green: group 1: >17–25%; orange: group 2: >25%.
doi:10.1371/journal.pone.0064433.g002

parametric Kruskal-Wallis test with the critical p-value of 0.05 was further used to determine whether a significant difference of each metabolite obtained from PLS-DA models existed between at least two groups. In case of significance, pairwise comparisons were performed (p-value was corrected to take into account multiplicity of comparisons). This test was conducted using the R software (version 2.12.1).

Adjustments for confounding factors

The previous step was used to identify the metabolites of interest. Polytomous regressions, using spectral data before filtering by OSC, were used to confirm the relations between exposure groups and the concentrations of urinary metabolites previously identified, taking into account individual characteristics of the women. The dependent variable was the exposure group (3 levels) and results from these analyses were reported as the odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) for each group of exposure (with group 0 as reference) associated with 1 unit increase of the metabolite (treated in continuous). In these analyses, 1 unit = (area under the pic of the bucket of the metabolite/total area of the spectrum) * 10000. The literature suggested some major confounding factors such as age, gender, height or weight, body mass index (BMI) and lifestyle [29], [30], [31], [32]. Educational level (middle/high school, baccalaureate or post-secondary level), maternal age (continuous), parity (1; 2; >2), BMI (continuous), alcohol consumption (no alcohol during pregnancy; occasionally or one glass a day) and smoking status (non-smoker or ex-smoker; stopped smoking in early pregnancy; smoker) were considered as potential confounders and were retained in the model if the likelihood ratio (LR) test was statistically significant for at least one metabolite. Age, parity, BMI and smoking status met this criterion. We used the LR test to select confounders because this one compare nested models in term of goodness of fit. Two missing values were replaced with the median value for BMI and the mode for smoking status. SAS software (version 9.3, SAS Institute) was used for these analyses.

Results

Table 1 describes the characteristics of enrolled women. Most of them are 25–35 years old (79.5%) with a BMI≤25 (80.7%). The median maternal age at inclusion was 29.3 years old (range 21.5 – 40.9). 59% have a high educational level (post-secondary). 65% already have at least one child and 71.1% didn't smoke while 15.7% stopped during the first trimester. Alcohol consumption was limited with only 13.3% of women reporting an occasional or regular consumption (at least 1 glass a day, only 1 woman). Among the various characteristics studied, only parity differs between the exposure groups (p-value<0.05, see Table 1). Differences were also observed for maternal age, BMI or smoking habits, but these did not attain statistical significance.

The preliminary PCA identified 3 outliers among the 86 eligible women according to the 4 criteria mentioned in the figure 1. The first woman has a high concentration of urinary glucose and was identified as diabetic. The second one has no specific characteristics compared to the other individuals but a high concentration

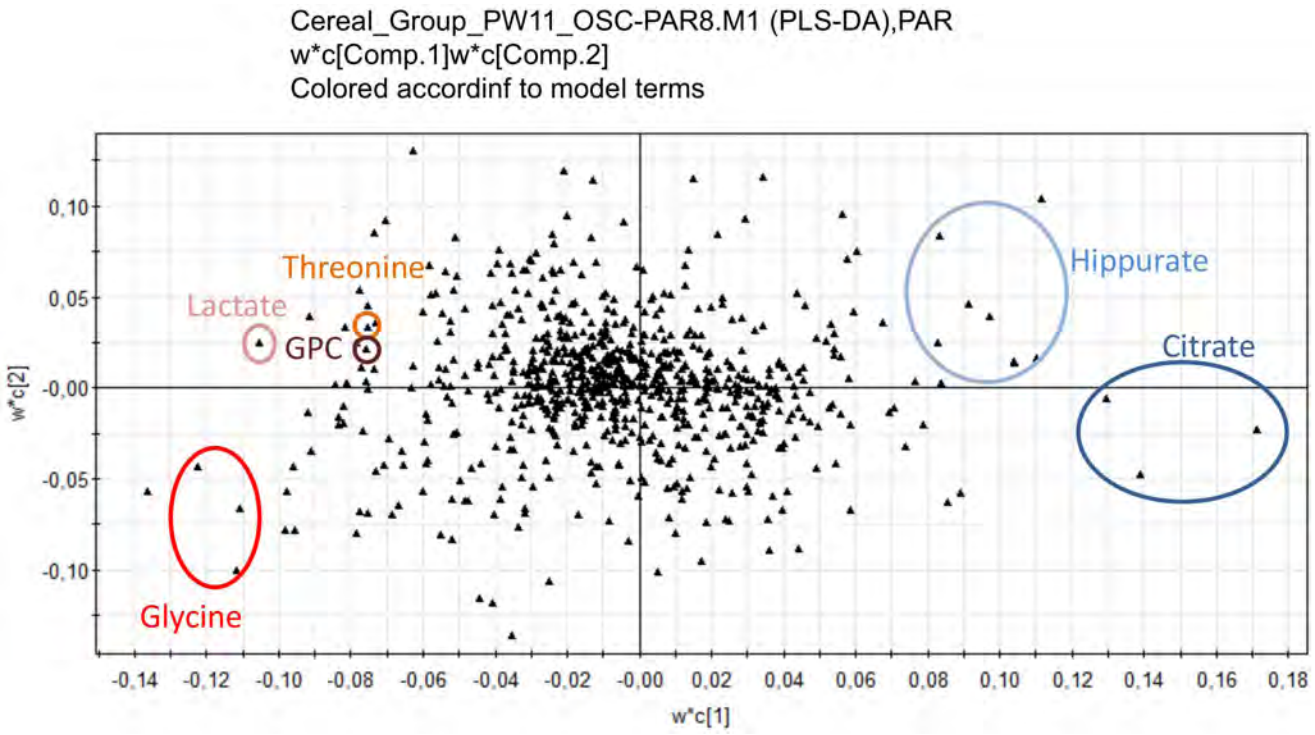


Figure 3. Graphical summary of the correlation between X and Y for the first two components. The correlation between X and Y (w*c) is represented by the loading plot. The PLS-DA model used was constructed on OSC-filtered and Pareto scaled data (N = 83; R2 = 90.7% and Q2 = 0.53), from the ^{1}H NMR urinary metabolic profiles from 83 pregnant women differently exposed to pesticides.
doi:10.1371/journal.pone.0064433.g003

of hippurate was detected in her urinary sample. A specific dietary habit (benzoate-rich diet for example) may have contributed to this high level of hippurate. The last woman did not appear to have any specific characteristics but her urinary sample was extremely diluted, which could explain a different spectrum compared to the other individuals.

A PLS-DA model comprising four latent variables was constructed on OSC-filtered (eight components removed) and Pareto-scaled data. The 3 exposure groups are correctly discriminated (R2 = 90.7% and Q2 = 0.53). The first two latent variables accounted for a high proportion of total variance (71%). Figure 2 shows projection of the observations (the women) onto the two first principal components (the score plot). This figure shows that the first group (lesser-exposed, called group 0 and corresponding to a 0% to 17% level of surface area of land dedicated to cereal crops in the town of residence) is separated from the more exposed groups (groups 1 and 2) by the first component, while group 1 (cereal >17%–25%) is separated from group 2 (cereal >25%) by the second component.

More than 60 variables (buckets) were considered important in the PLS-DA model (VIP>2). Figure 3 shows the correlation between variables and components. Among them, 17 variables were statistically significantly different between the first and the other groups of exposure (1 versus 2 and 3 or 1 versus 3) (Kruskal-Wallis test, $p<0.05$). The most statistically significant changes with OSC data were observed for glycine, lactate, threonine and glycerophosphocholine (GPC) (on the left of the loading plot) with an upward trend, and citrate and hippurate (on the right of the

Table 2. Urinary metabolites discriminated between the 3 groups of pesticide exposures (assessed from the percentage of the surface of land dedicated to cereal crops in the town of residence in early pregnancy) with a PLS-DA model including 4 latent variables on Pareto scaled data (N = 83; R2 = 90.7% and Q2 = 0.53), after an orthogonal signal correction.

Metabolites	Chemical shifts (corresponding to the variables)	Trends	p-values [OSC-data]
Glycine	*δ 3,545 ppm*	↗	3.50E-6
Threonine	*δ 4,235 ppm*	↗	3.33E-4
Lactate	*δ 4,095 ppm*	↗	2.91E-4
GPC	*δ 4,285 ppm*	↗	5.00E-4
Citrate	*δ 2,665 – 2,545 – 2,525 ppm*	↘	9.72E-6
Hippurate	*δ 7,645 – 7,565 – 7,555 – 3,975 ppm*	↘	6.39E-5

Abbreviation: GPC: glycerophosphocholine. The trends are observed after an OSC filtering. The significance was assessed with a non-parametric Kruskal-Wallis test (threshold 0.05).
doi:10.1371/journal.pone.0064433.t002

Table 3. Association between urinary metabolite changes in pregnant women and exposure to pesticides (assessed from the percentage of the surface of land dedicated to cereal crops in the town of residence in early pregnancy).

Metabolite	Groups of exposure	n	Crude OR (95%CI)	Adjusted[a] OR (95%CI)	p-value
Glycine	0	40	Ref	Ref	
	1	20	1.25 (1.10; 1.43)	1.29 (1.10; 1.52)	0.002
	2	23	1.19 (1.05; 1.35)	1.28 (1.09; 1.50)	0.003
Threonine	0	40	Ref	Ref	
	1	20	1.54 (1.04; 2.28)	1.57 (0.99; 2.51)	0.06
	2	23	1.79 (1.21; 2.64)	1.98 (1.21; 3.22)	0.006
Lactate	0	40	Ref	Ref	
	1	20	1.35 (1.11; 1.64)	1.36 (1.08; 1.71)	0.008
	2	23	1.38 (1.13; 1.67)	1.47 (1.16; 1.87)	0.002
GPC	0	40	Ref	Ref	
	1	20	1.17 (0.98; 1.40)	1.25 (1.00; 1.55)	0.05
	2	23	1.20 (1.01; 1.42)	1.35 (1.07; 1.69)	0.01
Citrate	0	40	Ref	Ref	
	1	20	0.98 (0.97; 1.00)	0.98 (0.96; 1.00)	0.03
	2	23	0.98 (0.97 ; 1.00)	0.97 (0.95; 1.00)	0.02
Hippurate	0	40	Ref	Ref	
	1	20	1.00 (0.99; 1.01)	0.99 (0.98; 1.00)	0.27
	2	23	1.00 (0.99; 1.01)	1.00 (0.99; 1.01)	0.62

[a]Adjusted for maternal age, body mass index, parity and smoking status.
doi:10.1371/journal.pone.0064433.t003

loading plot), with a downward trend. The metabolites associated with their p-values are given in Table 2. Trends in crude associations as estimated by polytomous regressions using spectral data before filtering by OSC (Table 3) were similar to what was observed in table 2 except for hippurate. Adjustment for smoking status, BMI, age and parity, provided trends similar or slightly increased: upward trends for glycine, threonine, lactate and GPC, a downward trend for citrate, and no association for hippurate (Table 3). As an example, compared to exposure group 0 (cereal $\leq$17%), a unit increase in lactate level multiplies the odds of belonging to exposure group 1 (cereal >17%–25%) and group 2 (cereal >25%) by 1.36 and 1.47 respectively.

Discussion

This work is an exploratory study designed to test whether the use of metabolomics could help uncover metabolic modifications related to exposure to complex mixtures. It shows an association between the modifications of different urinary metabolites in women in early pregnancy and their exposure to low doses of complex pesticide mixtures. Five metabolites were identified having significantly different urinary concentrations according to the most contrasted exposure groups, after adjusting for maternal age, parity, BMI and smoking habits. Glycine, threonine, lactate and GPC were significantly increased while citrate was decreased. These metabolites are involved in amino-acids metabolism, oxidation/reduction pathways and mitochondrial metabolism (citrate cycle) as shown in Figure 4. Glycine is a cytoprotective agent because it scavenges reactive oxygen species (ROS) and inhibits inflammatory response. It is also a major inhibitory neurotransmitter in the central nervous system [33]. According to previous data showing ROS generation after exposure to organophosphorous or pyrethroids [34], [35], we hypothesize that the increase in urinary glycine could result from a protective mechanism against the oxidative stress induced by a more complex exposure to pesticides. This oxidative stress may induce a mitochondrial dysfunction with an impairment of the tricarboxylic acid (TCA) cycle resulting in a decrease in citrate levels. The observed increase in urinary lactate supports the hypothesis of an alteration of the energy metabolism [36]. GPC plays an important role in the structural integrity of cell membranes [37]. Its increase suggests a protective mechanism against cell damage which could also be a consequence of the oxidative stress. Threonine plays an important role in the TCA cycle. Its catabolism in mammals forms 2-oxobutyrate, glycine and acetylCoA [38]. Its increase could be linked with a disruption in the TCA cycle. But amino-acids such as threonine join the fetal blood through active transport systems in the placenta [39]. An increase in urinary threonine could also be due to an enhancement in plasmatic threonine induced by a disruption of fetoplacental transfers as has been observed in mothers delivering very low birth weight infants [40]. This metabolic change may be a consequence of an adverse effect on the placenta induced by the oxidative stress.

Pesticide exposure was assessed in an indirect way, according to the percentage of cultures in women's towns of residence. There are some limitations to understanding of the relationships between residential proximity to agricultural activities and real individual exposures. However, different studies showed that residential proximity to agricultural pesticide applications could increase exposure to pesticides. Gunier et al. showed a correlation between concentrations of chlorpyrifos, chlorthal-dimethyl, iprodione, phosmet and simazine in house dust (89 dwellings) and the proximity of agricultural activities (within 1,250 m). These concentrations were lower in dwellings without nearby agricultural use [4]. Bradman et al. studied the determinants of organophosphorous exposure in 400 Californian children and showed that

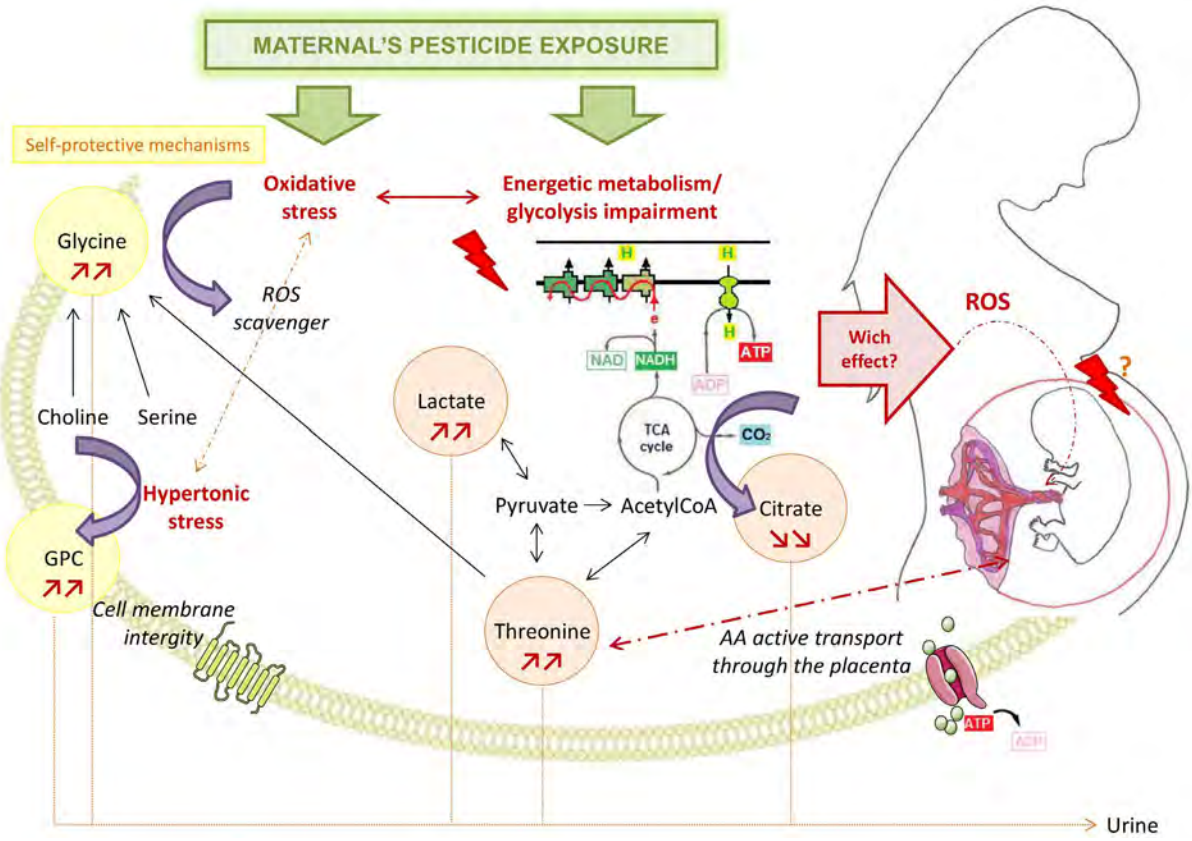


Figure 4. Suggested mechanisms of action of complex and low-dose pesticide mixtures. These suggestions are based on the modification of ^{1}H NMR urinary metabolic profile of pregnant women.
doi:10.1371/journal.pone.0064433.g004

among the 12-month-old infants, the concentrations of dialkylphosphate metabolites (coming from organophosphorus) in urine were higher when children lived within 60 m of an agricultural field [5]. Rural residence and close proximity to a farm were also found to be risk factors for pesticide exposure in 190 Chilean children [41]. Therefore, the use of the percentage of cereal cultures in the women's town of residence appears to be a good surrogate for the assessment of complex pesticide exposures. Moreover, preliminary results of an ongoing study on several women of the PELAGIE cohort show that the presence of urinary metabolites of fungicides used in cereal cultures increases with the percentage of these cultures in the town of residence.

Identification of metabolic changes directly in humans may be difficult due to the high number of factors influencing urinary metabolome such as genetics, sex, age, diurnal variation, cultural trends, diet, lifestyle, stress… [42]). Only a limited number of confounding factors were taken into account (age, parity, BMI and smoking status). We noticed that adjustment for these factors did not attenuate the initial trends observed. The PELAGIE population is relatively homogeneous in terms of cultural, dietary trends (women from western France) and age (childbearing age). Regarding diet prior to urine collection and time of collection, we can assume that these uncontrolled factors should be evenly distributed according to exposure group.

In conclusion, this study is a first exploratory work studying the link between metabolic changes and low-dose/complex exposures in environmental health. It can be hypothesized from identified discriminating metabolites that environmental exposure to pesticides could increase oxidative stress and disturb energy metabolism, possibly resulting in disruptions to transplacental exchanges. These observations could have an impact on the offspring but new studies on metabolic profile in newborns are needed to confirm this first hypothesis. Furthermore, an experimental confirmation of oxidative stress hypothesis could be helpful, and this is planned as the next step of this investigation.

Acknowledgments

We thank Roselyne Gautier (INRA) for her help in the preparation of the urine samples; and many thanks to Nathalie Costet and Tania Serrano-Chavez (INSERM) for their advices in statistics and in the search for pesticide uses in France.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SC C. Chevrier JPC C. Canlet NB. Performed the experiments: NB C. Canlet. Analyzed the data: NB MTF C. Canlet C. Chevrier CW. Wrote the paper: NB MTF C. Chevrier C. Canlet CW JPC SC.

References

1. Clayton AC, Pellizzari ED, Whitmore RW, Quackenboss JJ, Adgate J, et al. (2003) Distributions, associations, and partial aggregate exposure of pesticides and polynuclear aromatic hydrocarbons in the Minnesota Children's Pesticide Exposure Study (MNCPES). J Expo Anal Environ Epidemiol 13: 100–111.

2. Whyatt RM, Barr DB, Camann DE, Kinney PL, Barr JR, et al. (2003) Contemporary-use pesticides in personal air samples during pregnancy and blood samples at delivery among urban minority mothers and newborns. Environ Health Perspect 111: 749–756.
3. Ward MH, Lubin J, Giglierano J, Colt JS, Wolter C, et al. (2006) Proximity to crops and residential exposure to agricultural herbicides in Iowa. Environ Health Perspect 114. (6): 893–897.
4. Gunier RB, Ward MH, Airola M, Bell EM, Colt J, et al. (2011) Determinants of agricultural pesticide concentrations in carpet dust. Environ Health Perspect 119: 970–976.
5. Bradman A, Castorina R, Boyd Barr D, Chevrier J, Harnly ME, et al. (2011) Determinants of organophosphorus pesticide urinary metabolite levels in young children living in an agricultural community. Int J Environ Res Public Health 8: 1061–1083.
6. Agreste Bretagne. Enquêtes sur les pratiques culturales en 2006: les pratiques phytosanitaires progressent avec la réglementation [in French]. Ministère de l'alimentation, de l'agriculture et de la pêche. 2009. Available: http://www.agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf_R5309A06.pdf. Accessed 2012 Oct 12.
7. Fukuto TR (1990) Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. Environ Health Perspect 87: 245–254.
8. Soderlund DM, Clark JM, Sheets LP, Mullin LS, Piccirillo VJ, et al. (2002) Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. Toxicology 171: 3–59.
9. Kamel F, Hoppin JA (2004) Association of pesticide exposure with neurologic dysfunction and disease. Environ Health Perspect 112: 950–958.
10. Rauch SA, Braun JM, Barr DB, Calafat AM, Khoury J, et al. (2012) Associations of prenatal exposure to organophosphate pesticide metabolites with gestational age and birth weight. Environ Health Perspect 120(7):1055–1060.
11. Wolff MS, Engel S, Berkowitz G, Teitelbaum S, Siskind J, et al. (2007) Prenatal pesticide and PCB exposures and birth outcomes. Pediatr Res 61: 243–250.
12. Bouchard MF, Chevrier J, Harley KG, Kogut K, Vedar M, et al. (2011) Prenatal exposure to organophosphate pesticides and IQ in 7-year-old children. Environ Health Perspect 119(8): 1189–1195.
13. Eskenazi B, Rosas LG, Marks AR, Bradman A, Harley K, et al. (2008) Pesticide toxicity and the developing brain. Basic & Clinical Pharmacology and Toxicology 102: 228–236.
14. London L, Beseler C, Bouchard MF, Bellinger DC, Colosio C, et al. (2012) Neurobehavioral and neurodevelopmental effects of pesticide exposures. Neurotoxicology 33(4):887–896.
15. Chevrier C, Limon G, Monfort C, Rouget F, Garlantezec R, et al. (2011) Urinary biomarkers of prenatal atrazine exposure and adverse birth outcomes in the PELAGIE birth cohort. Environ Health Perspect 119(7): 1034–1041.
16. Petit C, Chevrier C, Durand G, Monfort C, Rouget F, et al. (2010) Impact on fetal growth of prenatal exposure to pesticides due to agricultural activities: a prospective cohort study in Brittany, France. Environ Health 9: 71.
17. Xiang H, Nuckols JR, Stallones L (2000) A geographic information assessment of birth weight and crop production patterns around mother's residence. Environ Res 82: 160–167.
18. Schreinemachers DM (2003) Birth malformations and other adverse perinatal outcomes in four U.S. wheat-producing states. Environ Health Perspect 111: 1259–1264.
19. Lindon JC, Holmes E, Bollard ME, Stanley EG, Nicholson JK (2004) Metabonomics technologies and their applications in physiological monitoring, drug safety assessment and disease diagnosis. Biomarkers 9: 1–31.
20. Vlaanderen J, Moore LE, Smith MT, Lan Q, Zhang L, et al. (2010) Application of OMICS technologies in occupational and environmental health research; current status and projections. Occup Environ Med 67: 136–143.
21. Robertson DG, Watkins PB, Reily MD (2011) Metabolomics in toxicology: preclinical and clinical applications. Toxicol Sci 120: S146–70.
22. Kuo CH, Wang KC, Tian TF, Tsai MH, Chiung YM, et al. (2012) Metabolomic characterization of laborers exposed to welding fumes. Chem Res Toxicol 25: 676–686.
23. Ellis J, Athersuch T, Thomas L, Teichert F, Perez-Trujillo M, et al. (2012) Metabolic profiling detects early effects of environmental and lifestyle exposure to cadmium in a human population. BMC Medicine 10: 61.
24. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E (1999) 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. Xenobiotica 29: 1181–1189.
25. Elliott P, Peakman TC (2008) The UK Biobank sample handling and storage protocol for the collection, processing and archiving of human blood and urine. Int J Epidemiol 37: 234–244.
26. Maher AD, Zirah SF, Holmes E, Nicholson JK (2007) Experimental and analytical variation in human urine in 1H NMR spectroscopy-based metabolic phenotyping studies. Anal Chem 79: 5204–5211.
27. Eriksson L, Johansson E, Kettaneh-Wold N, Trygg J, Wikstrom C, et al. (2006) Multi- and megavariate data analysis part I. basic principles and applications. Second revised and enlarged edition. Umea, Sweden: Umetrics Academy Press. 452 p.
28. Wold S, Antti H, Lindgren F, Ohman J (1998) Orthogonal signal correction of near-infrared spectra. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 44: 175–185.
29. Kochhar S, Jacobs DM, Ramadan Z, Berruex F, Fuerholz A, et al. (2006) Probing gender-specific metabolism differences in humans by nuclear magnetic resonance-based metabonomics. Anal Biochem 352: 274–281.
30. Bertram HC, Duus JO, Petersen BO, Hoppe C, Larnkjaer A, et al. (2009) Nuclear magnetic resonance-based metabonomics reveals strong sex effect on plasma metabolism in 17-year-old Scandinavians and correlation to retrospective infant plasma parameters. Metabolism 58: 1039–1045.
31. Gu H, Pan Z, Xi B, Hainline BE, Shanaiah N, et al. (2009) 1H NMR metabolomics study of age profiling in children. NMR In Biomedicine 22: 826–833.
32. D'Adamo P, Ulivi S, Beneduci A, Pontoni G, Capasso G, et al. (2010) Metabonomics and population studies: age-related amino acids excretion and inferring networks through the study of urine samples in two Italian isolated populations. Amino Acids 38: 65–73.
33. Petrat F, Boengler K, Schulz R, de Groot H (2012) Glycine, a simple physiological compound protecting by yet puzzling mechanism(s) against ischaemia-reperfusion injury: current knowledge. Brit J Pharmacol 165: 2059–2072.
34. Li HY, Wu SY, Ma Q, Shi N (2011) The pesticide deltamethrin increases free radical production and promotes nuclear translocation of the stress response transcription factor Nrf2 in rat brain. Toxicol Ind Health 27: 579–590.
35. Lee JE, Park JH, Shin IC, Koh HC (2012) Reactive oxygen species regulated mitochondria-mediated apoptosis in PC12 cells exposed to chlorpyrifos. Toxicol Appl Pharmacol 263(2):148–162.
36. Verwaest KA, Vu TN, Laukens K, Clemens LE, Nguyen HP, et al. (2011) 1H NMR based metabolomics of CSF and blood serum: A metabolic profile for a transgenic rat model of Huntington disease. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease 1812: 1371–1379.
37. Klein J (2000) Membrane breakdown in acute and chronic neurodegeneration: focus on choline-containing phospholipids. J Neural Transmission 107: 1027–1063.
38. Boehm G, Cervantes H, Georgi G, Jelinek J, Sawatzki G, et al. (1998) Effect of increasing dietary threonine intakes on amino acid metabolism of the central nervous system and peripheral tissues in growing rats. Pediatr Res 44: 900–906.
39. Regnault TRH, Friedman JE, Wilkening RB, Anthony RV, Hay J (2005) Fetoplacental transport and utilization of amino acids in IUGR: a review. Placenta 26, Supplement: S52-S62.
40. Tea I, Le Gall G, Kuster A, Guignard N, Alexandre-Gouabau MC, et al. (2012) 1H NMR based metabolic profiling of maternal and umbilical cord blood indicates altered materno-foetal nutrient exchange in preterm infants. PLoS One. 2012;7(1):e29947.
41. Munoz-Quezada MT, Iglesias V, Lucero B, Steenland K, Barr DB, et al. (2012) Predictors of exposure to organophosphate pesticides in schoolchildren in the Province of Talca, Chile. Environ Int 47: 28–36.
42. Lenz EM, Bright J, Wilson ID, Hughes A, Morrisson J, et al. (2004) Metabonomics, dietary influences and cultural differences: a 1H NMR-based study of urine samples obtained from healthy British and Swedish subjects. J Pharm Biomed Anal 36: 841–849.

6. Discrimination métabolique chez l'enfant à la naissance en fonction des expositions maternelles au cours de la grossesse

A partir des groupes initialement constitués chez les femmes enceintes (relatifs au pourcentage de cultures de céréales dans la commune de résidence), une analyse similaire a été effectuée pour comparer les profils métaboliques des sangs de cordon. L'analyse de la littérature ayant révélé des différences de profils métaboliques entre les individus de sexe féminin ou masculin, il a été décidé de séparer les garçons et les filles. Les données présentées ici ne concernent, pour l'instant, que la comparaison des profils métaboliques des garçons en lien avec les groupes d'expositions des mères aux pesticides (n = 145).

Une analyse de sensibilité a modifié substantiellement les résultats à la fois sur les métabolites impliqués que sur les niveaux de risque lorsque l'on incluait ou pas les femmes hypertendues ou diabétiques (n = 11). Cette analyse nous a conduits à les exclure.

Une ACP préliminaire a révélé l'existence de 4 outliers, qui ont par la suite été exclus des analyses. Le spectre RMN du premier a montré la présence d'éthanol (quadruplet à 3,66 ppm et triplet à 1,19 ppm), et également un signal d'acétate très important (1,91 ppm). Le second avait beaucoup plus de créatinine et de pyruvate que les autres individus, et le troisième et le quatrième semblaient avoir plus de lipides (signaux importants autour de 0,8 ppm et 1,28 ppm).

Le tableau 4 décrit les caractéristiques de la population d'étude (n=130 garçons). Il montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les caractéristiques maternelle et du nouveau-né entre les groupes d'exposition aux pesticides, excepté pour l'âge gestationnel à la naissance (les femmes les moins exposées ont eu plus souvent un nouveau-né à 37-38 semaines de grossesse que les femmes les plus exposées (p = 0,046)).

Tableau 1 : Description de la population des 130 garçons nés de femmes incluses en 2004

Caractéristiques maternelles	Groupe 0 (N=66) n (%)	Groupe 1 (N=38) n (%)	Groupe 2 (N=26) n (%)	p-value*
Département de résidence				
35	34 (52.5)	22 (57.9)	8 (30.8)	
22	30 (45.5)	16 (42.1)	18 (69.2)	
29	2 (3.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	*0.12*
Age maternel (médiane [Q1-Q3]	30.5 [26.9-32.8]	30.4 [27.2-32.2]	29.3 [27.5-32.5]	0.92
<25	7 (10.6)	2 (5.3)	0 (0.0)	
25 – 30	24 (36.4)	14 (36.8)	15 (57.7)	
30 – 35	28 (42.4)	19 (50.0)	8 (30.8)	
≥ 35	7 (10.6)	3 (7.9)	3 (11.5)	*0.35*
IMC avant grossesse (médiane [Q1-Q3]	21.5 [20.2-23.7]	21.7 [20.3-23.9]	22.1 [20.2-25.9]	0.92
<18.5	2 (3.1)	0 (0.0)	3 (11.5)	
18.5 – 25	52 (80.0)	31 (81.6)	17 (65.4)	
≥ 25	11 (16.9)	7 (18.4)	6 (23.1)	*0.20*
Parité				
0	29 (43.9)	11 (29.0)	7 (26.9)	
1	21 (31.8)	18 (47.4)	14 (53.9)	
≥ 2	16 (24.2)	9 (23.7)	5 (19.2)	0.26
Niveau d'études				
Inférieur au baccalauréat	13 (19.7)	9 (23.7)	5 (19.2)	
Baccalauréat	14 (21.2)	8 (21.1)	9 (34.6)	
Etudes supérieures	39 (59.1)	21 (55.3)	12 (46.2)	0.67
Statut tabagique à l'inclusion				
Non/ ex-fumeuse	48 (73.8)	26 (68.4)	17 (65.4)	
Fumeuse en début grossesse	5 (7.7)	5 (13.2)	5 (19.2)	
Fumeuse à l'inclusion	12 (18.5)	7 (18.4)	4 (15.4)	*0.60*
Consommation d'alcool à l'inclusion				
Jamais	53 (80.3)	30 (79.0)	23 (88.5)	
Occasionnellement	10 (15.2)	8 (21.0)	3 (11.5)	
Au moins un verre/ jour	3 (4.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	*0.57*
Age gestationnel (médiane [Q1-Q3]	40.0 (39.0 ; 40.0)	39.5 (38.5 ; 40.0)	39.0 (39.0 ; 40.0)	0.75
37 – 38	14 (21.2)	10 (26.3)	0 (0.0)	0.046
39 – 40	35 (53.0)	19 (50.0)	21 (80.8)	
41 – 42	17 (25.8)	9 (23.7)	5 (19.2)	
Accouchement				
Naturel	53 (80.3)	31 (81.6)	22 (84.6)	0.89
Par césarienne	13 (19.7)	7 (18.4)	4 (15.4)	
Caractéristiques des nouveau-nés				
Poids de naissance (médiane [Q1-Q3])	3590 [3250-3810]	3565 [3250-3800]	3570 [3320-3840]	0.69
Taille de naissance (médiane [Q1-Q3])	51.0 (49.5 ; 51.5)	50.3 (49.0 ; 51.3)	50.5 (49.5 ; 52.0)	0.69
Périmètre crânien(médiane [Q1-Q3])	35.0 (34.5 ; 36.0)	35.0 (34.0 ; 36.0)	35.0 (34.5 ; 36.0)	0.83
Score d'Apgar 1 min (médiane [Q1-Q3]	10.0 (10.0 ; 10.0)	10.0 (10.0 ; 10.0)	10.0 (10.0 ; 10.0)	0.75
<6	3 (4.6)	1 (2.7)	1 (3.8)	*0.91*
6 à 9	10 (15.4)	6 (16.2)	6 (23.1)	
10	52 (80.0)	30 (81.1)	19 (73.1)	
Score d'Apgar 5 min (médiane [Q1-Q3]	10.0 (10.0 ; 10.0)	10.0 (10.0 ; 10.0)	10.0 (10.0 ; 10.0)	0.81
<10	5 (7.7)	3 (8.1)	3 (11.5)	*0.84*
10	60 (92.3)	34 (91.9)	23 (88.5)	

* : test du chi2, ou en italique, test de Fisher exact ; IMC : Indice de masse corporel

Un modèle de PLS-DA incluant 2 composantes principales a été construit à partir des données filtrées selon la méthode OSC (standardisation unité, 5 composantes exclues). Les 3 groupes d'exposition sont correctement séparés, comme le montre la projection des observations dans le premier plan PLS (figure 11) ainsi que les caractéristiques du modèle (R2 = 76,1 %, Q2 = 0,696).

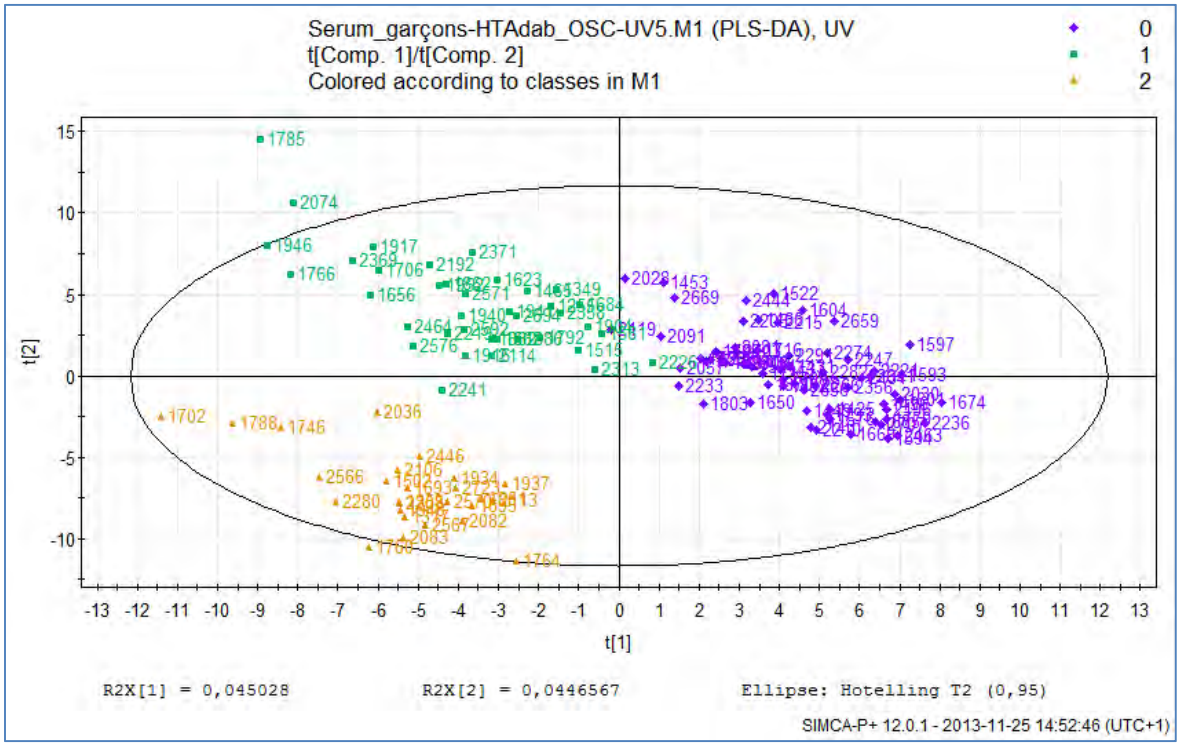


Figure 1 : Projection des observations (variables "exposition") dans le 1er plan obtenu à partir d'un modèle de PLS-DA appliqué aux données filtrées et standardisées (Unité). Le modèle est construit à partir des profils métaboliques RMN sanguins des 130 garçons éligibles. 2 composantes principales. N=130, R2=76,1 %, Q2=0,696. Coloré selon les groupes d'exposition : violet 0-17 % de cultures de céréales dans la commune, vert : >17-25 %, orange : >25 %

Plus de 234 variables ont été considérées comme importantes dans la construction de ce modèle (VIP > 1). Parmi elles, 189 étaient significatives (test de Kruskal-Wallis, p > 0,05) entre au moins 2 groupes d'exposition. Après ajustement sur les facteurs de confusion potentiels liés à la mère (âge en continu, IMC (< ou ≥ 25), parité (1, 2 ou > 3 enfants), statut tabagique par classe), et sur l'âge gestationnel (< 40, 40, > 40), une diminution d'acétate, citrate, diméthylamine, créatinine [potentiellement créatine], alanine, isoleucine, glutamate, lysine, sérine, et tyrosine a été mise en évidence, suggérant un impact potentiel sur le

métabolisme des acides aminés. On remarque que les augmentations d'aspartate, de valine et de lipides (lipoprotéines) significatives sur les données filtrées (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$) deviennent non significatives sur les données brutes. Seule une tendance est observée ($p > 0,05$). L'augmentation d'acéto-acétate reste significative mais surtout dans le groupe 1 ($p = 0,03$ et $0,06$) (Tableau 5).

Tableau 2 : Associations entre les modifications métaboliques sériques chez l'enfant et l'exposition des mères aux pesticides pendant la grossesse (évaluée à partir de la proportion de la surface de la commune de résidence dédiée à la culture de céréales) (analyses univariées et multivariées, régression logistique polytomique, variable expliquée : groupe d'exposition, n=130)

Métabolite	Groupes	n	OR brut (95% CI)	OR ajusté[a] (95% CI)	p-value
Acétate	0	66	Ref.	Ref.	
1.915-1.925-1.935	1	38	0.88 (0.74 ; 1.05)	0.85 (0.71 ; 1.03)	0.10
	2	26	**0.74 (0.55 ; 0.99)**	**0.69 (0.51 ; 0.94)**	0.02
Alanine	0	66	Ref.	Ref.	
1.455	1	38	1.10 (0.92 ; 1.31)	1.10 (0.91 ; 1.32)	0.33
	2	26	**1.23 (1.03 ; 1.47)**	**1.28 (1.06 ; 1.56)**	0.01
Créatinine	0	66	Ref.	Ref.	
3.055	1	38	0.36 (0.11 ; 1.17)	**0.26 (0.08 ; 0.91)**	0.04
	2	26	**0.15 (0.03 ; 0.89)**	**0.10 (0.02 ; 0.61)**	0.01
Créatine + créatinine	0	66	Ref.	Ref.	
3.045	1	38	0.52 (0.25 ; 1.05)	**0.43 (0.20 ; 0.91)**	0.03
	2	26	**0.28 (0.11 ; 0.72)**	**0.20 (0.07 ; 0.56)**	0.003
Isoleucine	0	66	Ref.	Ref.	
0.995-1.005	1	38	0.91 (0.76 ; 1.10)	0.89 (0.73 ; 1.08)	0.23
	2	26	**0.80 (0.64 ; 0.99)**	**0.75 (0.59 ; 0.95)**	0.02
Glutamate	0	66	Ref.	Ref.	
2.125-2.165 - 2.355-2.375	1	38	0.97 (0.89 ; 1.05)	0.95 (0.87 ; 1.03)	0.22
	2	26	**0.90 (0.82 ; 0.99)**	**0.87 (0.78 ; 0.97)**	0.01
Lysine	0	66	Ref.	Ref.	
1.485-1.535 - 1.885-1.905 - 3.025	1	38	0.96 (0.90 ; 1.02)	0.94 (0.88 ; 1.01)	0.09
	2	26	**0.92 (0.85 ; 0.99)**	**0.89 (0.82 ; 0.97)**	0.01
Sérine	0	66	Ref.	Ref.	
3.945-3.985	1	38	0.85 (0.70 ; 1.04)	**0.81 (0.65 ; 0.99)**	0.05
	2	26	**0.74 (0.58 ; 0.95)**	**0.68 (0.52 ; 0.89)**	0.005
Tyrosine	0	66	Ref.	Ref.	
6.895-6.905 - 7.185-7.195	1	38	0.89 (0.47 ; 1.68)	0.81 (0.41 ; 1.58)	0.53
	2	26	0.48 (0.21 ; 1.10)	**0.37 (0.16 ; 0.90)**	0.03
Méthylhistidine	0	66	Ref.	Ref.	
7.015 - 7.715	1	38	1.20 (0.34 ; 4.23)	1.12 (0.30 ; 4.22)	0.87
	2	26	**3.81 (1.12 ; 13.0)**	**5.10 (1.29 ; 20.12)**	0.02
Aspartate	0	66	Ref.	Ref.	
2.785-2.795	1	38	2.57 (0.70 ; 9.48)	3.61 (0.86 ; 15.14)	0.08
	2	26	2.86 (0.67 ; 12.12)	4.08 (0.83 ; 20.20)	0.08
Valine	0	66	Ref.	Ref.	
0.975 - 1.025 - 2.245	1	38	0.98 (0.85 ; 1.12)	0.94 (0.81 ; 1.10)	0.44
	2	26	1.11 (0.96 ; 1.29)	1.14 (0.97 ; 1.35)	0.11

Tableau 5, suite [Associations entre les modifications métaboliques sériques chez l'enfant et l'exposition des mères aux pesticides pendant la grossesse]

Métabolite	Groupes	n	OR brut (95% CI)	OR ajusté[a] (95% CI)	p-value
Citrate	0	66	Ref.	Ref.	
2.705	1	38	3.43 (0.21 ; 58.82)	5.60 (0.31 ; 102.43)	0.25
	2	26	**60.0 (2.13 ; >999)**	**134.83 (4.03 ; >999)**	0.006
Diméthylamine	0	66	Ref.	Ref.	
2.735	1	38	2.54 (0.47 ; 13.67)	2.38 (0.42 ; 13.70)	0.33
	2	26	**13.34 (2.60 ; 68.53)**	**20.32 (3.35 ; 123.32)**	0.001
lipides	0	66	Ref.	Ref.	
1.285	1	38	1.09 (0.92 ; 1.29)	1.12 (0.94 ; 1.33)	0.22
	2	26	1.15 (0.96 ; 1.39)	1.19 (0.98 ; 1.45)	0.08
Acéto-acétate	0	66	Ref.	Ref.	
2.225	1	38	**1.17 (1.01 ; 1.34)**	**1.18 (1.01 ; 1.38)**	0.04
	2	26	1.15 (0.98 ; 1.34)	**1.19 (1.00 ; 1.41)**	0.05
Lactate	0	66	Ref.	Ref.	
4.095-4.135	1	38	1.15 (0.96 ; 1.38)	**1.04 (1.00 ; 1.08)**	0.05
	2	26	0.94 (0.76 ; 1.17)	0.99 (0.95 ; 1.04)	0.86
Glucose + taurine	0	66	Ref.	Ref.	
3.415-3.425 - 3.245-3.255	1	38	**0.95 (0.90 ; 0.99)**	**0.94 (0.89 ; 0.99)**	0.01
	2	26	1.01 (0.95 ; 1.06)	1.00 (0.95 ; 1.06)	0.91
Glucose	0	66	Ref.	Ref.	
3.385-3.405- 3.455-3.505 -3.525-3.705	1	38	0.99 (0.98 ; 1.00)	**0.99 (0.98 ; 0.99)**	0.04
3.745 - 3.825-3.915 - 5.225-5.245	2	26	1.00 (0.99 ; 1.01)	1.01 (0.99 ; 1.02)	0.39
Glycerol	0	66	Ref.	Ref.	
3.625-3.635	1	38	**1.40 (1.04 ; 1.88)**	**1.39 (1.02 ; 1.91)**	0.04
	2	26	1.29 (0.92 ; 1.80)	1.28 (0.90 ; 1.82)	0.17
Choline	0	66	Ref.	Ref.	
3.205 - 4.065-4.075	1	38	**1.08 (1.02 ; 1.14)**	**1.08 (1.01 ; 1.15)**	0.02
	2	26	1.05 (0.98 ; 1.12)	1.05 (0.98 ; 1.12)	0.21
Lipides insaturés	0	66	Ref.	Ref.	
5.345-5.405	1	38	2.50 (0.97 ; 6.44)	**3.38 (1.13 ; 10.15)**	0.03
	2	26	0.75 (0.20 ; 2.79)	0.79 (0.19 ; 3.25)	0.74
Succinate	0	66	Ref.	Ref.	
2.405-2.415	1	38	**1.97 (1.14 ; 3.42)**	**2.06 (1.14 ; 3.72)**	0.02
	2	26	1.51 (0.80 ; 2.85)	1.61 (0.81 ; 3.19)	0.18
3-hydroxybutyrate	0	66	Ref.	Ref.	
1.215 - 2.425-2.455	1	38	**1.43 (1.04 ; 1.96)**	**1.49 (1.06 ; 2.11)**	0.02
4.145-4.155	2	26	1.16 (0.80 ; 1.69)	1.23 (0.82 ; 1.86)	0.32

[a] ajusté sur l'âge maternel (continu), l'indice de masse corporel (< ou ≥25), la parité (1; 2; 3+), le statut tabagique (non ou ex-fumeuse ; fumeuse au début de grossesse ; fumeuse à l'inclusion) et l'âge gestationnel (< 40 ; 40 ; > 40 semaines).

On remarque ainsi que les profils métaboliques des enfants à la naissance (basé sur l'analyse du sérum préparé à partir du sang de cordon) sont discriminés en lien avec les groupes d'expositions des femmes (estimées à partir d'indicateurs géographiques). On observe principalement une diminution significative des concentrations en acides aminés mais également en certains composés impliqués dans le cycle de Krebs ou qui en sont issus (figure 12). L'ajustement sur les facteurs de confusion modifie peu les estimations et permet en général de renforcer les OR retrouvés. L'ajustement supplémentaire sur le mode

d'accouchement et le résultat du test d'Apgar à 5 minutes ne modifie pas les résultats (résultats non présentés).

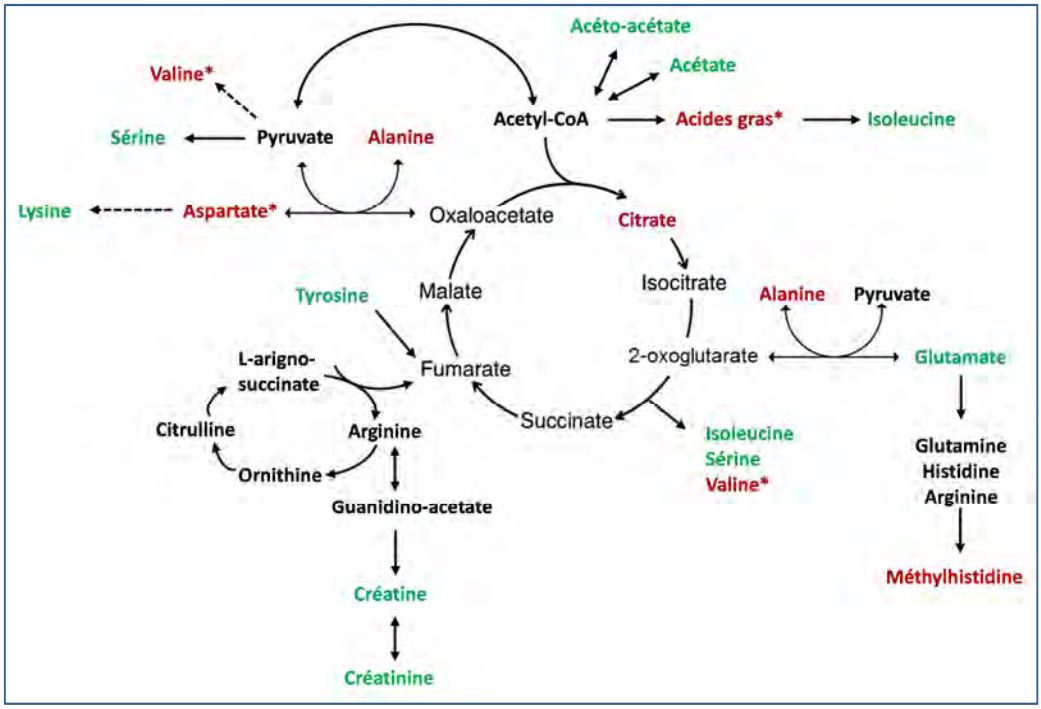


*Figure 2 : Voies métaboliques potentiellement modifiées chez l'enfant en lien avec les expositions environnementales prénatales aux pesticides [basées sur l'analyse des profils métaboliques des sangs de cordon (en rouge, augmentation des concentrations sérique, en vert, diminution des concentrations sériques, * tendance sans significativité)]*

L'hypothèse du stress oxydant identifiée à partir des profils métaboliques des urines des femmes en début de grossesse ne semble pas être retrouvée directement ici (pas de modifications visibles de molécules osmoprotectrices). En revanche, la diminution d'un certain nombre d'acides aminés sériques pourrait être en faveur d'une altération des échanges placentaires chez les femmes les plus exposées. On note également des modifications d'autres métabolites qui pourraient particulièrement être associés à une altération du métabolisme mitochondrial et lipidique (lactate, taurine, succinate, glucose, glycérol, choline, lipides insaturés, et 3-hydroxybutyrate). Néanmoins pour ces métabolites, seul le groupe 1 apparaît concerné (celui dont la surface en cultures de céréales est comprise entre 17 et 25 % de la commune), ce qui n'est pas en faveur d'une relation dose-réponse. Ces observations ne sont donc pas interprétables au regard des groupes d'exposition constitués.

7. Etude du lien entre proximité aux cultures et expositions aux pesticides (travaux associés)

Vivre en milieu rural ou à proximité d'activités agricoles est un facteur de risque de l'exposition aux pesticides (voir chapitre 1.3.). La plupart des travaux ayant étudié ce déterminant de l'exposition est basée sur des populations du continent américain (Etat de Washington, Californie, Chili) et il est possible que les pratiques agricoles et les usages de pesticides ne soient pas directement transposables au contexte français. A ce jour, seulement une étude récente s'est intéressée à une population française (fréquence plus élevée de métabolites d'herbicides chloroacétanilides utilisés pour le maïs dans les urines des femmes vivant en milieu rural, association entre présence de métabolites d'atrazine et la proximité des cultures de maïs (Chevrier *et al.* 2014)).

Pour confirmer l'hypothèse d'un lien entre l'exposition aux pesticides et la proximité à des activités agricoles déjà observée, et aller plus loin dans la caractérisation des expositions des femmes enceintes aux pesticides, le développement d'une méthode d'exposomique[1] permettant la caractérisation non-ciblée de métabolites de pesticides a été réalisé. Cette méthode originale est basée sur la chromatographie en phase liquide à ultra-haute performance (UHPLC) couplée à la HRMS. Elle permet à la fois de détecter de manière semi-quantitative des métabolites de pesticides de façon non ciblée et sans *a priori* et d'en identifier la structure grâce à des expériences de SM multidimensionnelle (MS^n). Cette méthode a été appliquée à un sous-échantillon de 40 femmes enceintes provenant de la cohorte PELAGIE (tirage aléatoire de 10 femmes parmi les groupes : femmes résidant dans des communes de plus de 20 000 habitants, femmes résidant dans des communes où la part de culture de céréales représente respectivement 0-17 %, de 17 à 25 % et plus de 25 %). L'identification des pesticides dans les urines des femmes a été faite sur la base d'une liste de presque 400 métabolites correspondant à 47 pesticides potentiellement utilisés en Bretagne en 2004. Cette étude a montré que la détection et la caractérisation de plusieurs

[1] Analyse haut-débit de l'exposome. L'exposome peut être défini comme l'ensemble des expositions d'un individu au cours de sa vie, en lien avec la santé (mesure des expositions environnementales, professionnelles, alimentaires ou style de vie, et mesure des interactions avec les caractéristiques individuelles génétiques, épigénétiques, physiologiques et métaboliques).

métabolites de pesticides étaient possibles, et les groupes de femmes ont été discriminés à partir de 8 métabolites correspondant à 2 fongicides utilisés sur les cultures céréalières en 2004 (l'azoxystrobine et le fenpropimorphe) (Jamin *et al.* 2014) (annexe 5).

Ces premiers résultats sont de nature à remettre en partie en question les techniques habituelles de hiérarchisation des substances qui sont souvent basées sur les pratiques agricoles, la topographie et les propriétés physico-chimiques des substances, et qui sont utiles pour l'estimation des expositions de la population ou la mise en œuvre de programmes de biosurveillance. Par exemple, l'azoxystrobine est une substance peu volatile rarement hiérarchisée et donc peu mesurée. La présence plus importante de métabolites de cette molécule dans les urines des femmes vivant dans des communes où une large part des surfaces est dédiée à la culture de céréales suggère que la contamination aérienne n'est pas la seule source d'exposition aux pesticides à proximité des activités agricoles. Ainsi le développement de ce type d'outils pour identifier les métabolites de pesticides dans les fluides biologiques humains, sans *a priori*, serait un atout majeur pour les institutions de santé publique et les gouvernements, qui pourraient fonder leur programmes de biosurveillance ou d'expologie sur les pesticides (ou métabolites) d'intérêt.

Cette approche, qui permet la mesure semi-quantitative des métabolites de pesticides, sera complétée par la mise à jour de la liste de pesticides à prendre en compte, l'analyse UHPLC-HRMS de l'ensemble de notre échantillon (n=338) et par une étape complémentaire de quantification des métabolites sur ces mêmes échantillons d'urines (en collaboration avec le Laboratoire d'étude et de recherche en environnement et santé (LERES) de l'EHESP). Une méthode d'analyse multi-résidus basée sur un couplage UHPLC et spectrométrie de masse en tandem (UHPLC-MS/MS) est en cours de développement. A l'heure actuelle, plus d'une vingtaine de molécules sont incluses dans cette méthode. La liste de pesticides ou métabolites sera complétée par des molécules détectées par l'approche non-ciblée décrite ci-dessus, dans la limite de la faisabilité technique (disponibilité du standard ou possibilité de fabrication, ce qui est indispensable à la quantification, et possibilité d'analyse avec la même méthode multi-résidus). A l'issue de ces travaux, une analyse statistique sera effectuée pour mettre en relation la caractérisation des pesticides ou métabolites (détection ou quantification) avec la résidence (céréales) mais également avec la proximité géographique

des zones de cultures (céréales, maïs, légumes) grâce au système d'information géographique déjà développé à l'INSERM (Chevrier *et al.* 2014).

CHAPITRE 4 : APPROCHE TOXICOLOGIQUE

Pour répondre au second objectif de la thèse, qui était d'améliorer les connaissances sur le rôle des expositions complexes aux pesticides sur la femme enceinte et le développement de l'enfant, et de comprendre les mécanismes à l'origine des modifications métaboliques observées directement chez l'Homme, une expérimentation animale a été mise en œuvre.

1. Stratégie d'étude

La stratégie d'étude correspond à :

- La constitution de groupes d'exposition : choix des pesticides et des niveaux de doses ;
- L'analyse chimiométrique (prise d'empreintes métaboliques sur les fluides et tissus biologiques par RMN, description ACP, modélisation PLS-DA) ;
- L'identification des métabolites discriminants et la génération d'hypothèses mécanistiques.

2. Choix des expositions : pesticides et niveaux de doses

Le choix des expositions et des groupes d'animaux a été guidé par les connaissances des expositions des femmes enceintes provenant de la cohorte PELAGIE et incluses en 2004 (qui correspond à l'échantillon sur lequel les analyses métaboliques ont été réalisées). Les femmes bretonnes sont exposées aux pesticides par l'alimentation générale (pas de spécificité bretonne), l'alimentation locale (pour une partie), les usages domestiques, l'eau de boisson, l'air et les poussières (proximité des cultures). Etant donné que la constitution des groupes d'exposition des femmes PELAGIE a été basée sur la proportion de cultures dans la commune, il apparaît important de se focaliser sur ce type d'expositions environnementales qui sont *a priori* relativement bien corrélées aux usages.

A partir des résultats des enquêtes d'usages des pesticides en Bretagne sur les grandes cultures (blé, maïs) qui ont été réalisées entre 2001 et 2005 et des données du cadastre des émissions des pesticides dans l'air réalisé en 2003 par l'association pour la surveillance de la qualité de l'air en Bretagne (Air Breizh), une première liste de 34 pesticides a pu être

proposée (annexe 3). Sur la base de cette liste, les pesticides ont été hiérarchisés à partir des données du cadastre des émissions. Ce cadastre était fondé sur les enquêtes des bassins versants, les propriétés physico-chimiques des substances actives et sur une démarche de dires d'experts. Il concernait les départements d'Ille et Vilaine et des Côtes d'Armor. Ont été retenues ensuite les molécules les plus contributives en quantité reçue sur les surfaces des communes d'Ille et Vilaine et de Côtes d'Armor, à savoir l'acétochlore (57 %), le chlorméquat (8,2 %), le carbofuran (5,3 %), l'éthéphon (5,3 %), le fenpropimorphe (3,5 %), l'imidaclopride (3 %), le glyphosate (2,8 %) et le bromoxynil (2,8 %). Ces 8 molécules représentaient à elles seules environ 90 % des quantités reçues. On peut noter toutefois un biais dans le choix de ces pesticides, étant donné que le cadastre des émissions ne hiérarchise pas l'ensemble des pesticides réellement utilisés sur le terrain (hiérarchisation préalable nécessaire pour la mesure, fondée sur la volatilité, la présence dans les eaux, les DJA).

En conclusion, deux groupes de rats ont été constitués de la manière suivante :

- Un lot témoin non exposé ;
- Un lot exposé aux 8 pesticides hiérarchisés ci-dessus, équivalent à une dose totale théorique d'environ 450 µg/kg/j (somme de leurs DJA respectives (Agritox, données provenant des décisions de l'Union Européenne[2])), mais en proportions représentatives des quantités reçues sur les surfaces des communes d'Ille et Vilaine et de Côtes d'Armor en 2003 (selon le cadastre des émissions d'Air Breizh), où l'acétochlore et le carbofuran prennent une part plus importante alors que le glyphosate et l'imidaclopride contribuent moins à la dose totale au regard de leur DJA (tableau 6).

Les installations expérimentales dont nous disposions ne permettant pas de procéder à une exposition des animaux par inhalation, nous avons opté pour une exposition par voie alimentaire en incorporant le mélange sélectionné à l'aliment distribué *ad libitum* aux rats.

[2] Source : http://www.agritox.anses.fr/php/fiches.php. Consultation du site en 2011 (anciennement http://www.dive.afssa.fr/agritox/php/fiches.php)

Tableau 3 : Exposition orale théorique (*ad libitum*) en µg/kg/j des rates gestantes du 4ème au 21ème jour de gestation et NOAEL (ou LOAEL) associé

Pesticide	Proportions des quantités reçues en Bretagne[a] (%)	Valeur du NOAEL (ou LOAEL*) utilisé pour construire la DJA[b] (µg/kg/j)	Expositions théoriques des rates en µg/kg/j
DOSE TOTALE			**447**
Acétochlore	*64,83*	*1080**	***290***
Bromoxynil	*3,16*	*1000*	***14***
Carbofuran	*6,03*	*30**	***27***
Chlorméquat	*9,33*	*4000*	***42***
Etéphon	*6,03*	*27000*	***27***
Fenpropimorphe	*4,02*	*300*	***18***
Glyphosate	*3,17*	*31000*	***14***
Imidaclopride	*3,43*	*3700*	***15***

[a] Selon le cadastre des émissions des pesticides dans l'air réalisé en 2003 par l'association pour la surveillance de la qualité de l'air en Bretagne (Air Breizh), départements d'Ille et Vilaine et Côtes d'Armor ; [b] recherche des doses journalières admissibles (DJA) construites pour protéger des expositions orales chroniques, Agritox, données provenant de l'Union Européenne [et EFSA si absence d'information Agritox].

3. Choix du protocole expérimental : individus, observations et recueils biologiques

Vingt rates gravides Wistar Crl :WI (Han) (10 par lot), reçues à 2 jours de gestation et à un poids moyen de 212 g, ont été acclimatées 2 jours avant l'exposition dans des conditions de température et de lumière contrôlées. Les femelles ont ensuite été nourries *ad libitum* du 4ème au 21ème jour de la gestation avec une alimentation exempte de pesticides (lot témoin), ou enrichie des différents pesticides selon le protocole présenté préalablement (lot exposé) (tableau 6). La consommation de nourriture et le poids corporel ont été suivis régulièrement. Au 13ème jour de gestation, 8 femelles par groupe ont été placées dans des cages à métabolisme, acclimatées pendant 2 jours, avant le recueil des urines de 24 heures (15ème jour de gestation). Ce recueil d'urine a été réalisé à la fin de l'organogenèse pour être cohérent avec le recueil des urines des femmes de la cohorte PELAGIE réalisé à la 11ème semaine de grossesse (en ce qui concerne les données exploitées à ce stade, n=83). A la fin de la gestation (21ème jour), juste avant la mise-bas, les femelles ont été sacrifiées. Le plasma a été recueilli puis congelé à -20°C jusqu'aux analyses. Parallèlement, les fœtus ont été extraits de l'utérus des mères afin de recueillir également le plasma (échantillons poolés de 3 individus par sexe et par portée). Le foie (lobe médian pour les femelles, pool de 3 foies

entier par sexe et par portée pour les fœtus) et le cerveau (entier pour les femelles, pool de 3 par sexe et par portée pour les fœtus) des animaux ont été récupérés, pesés et immédiatement congelés dans l'azote liquide jusqu'aux analyses.

4. Suivis des animaux au cours de l'expérimentation animale

Le suivi des femelles gestantes au cours de l'expérimentation animale montre que le groupe de rates exposées a consommé significativement plus d'aliments que le groupe de rates contrôles ($p < 0,05$). Cette différence devient néanmoins non significative lorsqu'elle est étudiée relativement au poids corporel initial des individus. Les femelles exposées ont un index hépatosomatique[3] significativement plus faible que les contrôles alors qu'il n'y a pas de différence dans le poids brut du foie. Les femelles exposées ont un cerveau significativement plus gros, mais la tendance disparaît lorsqu'on compare les poids relatifs. On peut même noter que dans le groupe exposé, le poids relatif du cerveau est inversement corrélé à l'exposition (estimée par la consommation alimentaire) ($r^2 = 0,48$; résultats non présentés). Enfin, on observe une diminution non significative du nombre de petits par portée dans le groupe exposé par rapport au groupe contrôle, avec une diminution significative du nombre de femelles ($p < 0,05$). Aucune différence significative n'a été observée pour les autres paramètres mesurés (gain de poids des animaux, poids du foie des mères, poids du cerveau des mères).

5. Discrimination métabolique chez des rates gestantes exposées à de faibles doses de pesticides

Les profils métaboliques de l'ensemble des fluides et tissus recueillis au cours de l'expérimentation (urine des femelles à GD15, plasma des mères juste avant la naissance, plasma des fœtus, foies et cerveau des mères et des fœtus) ont été réalisés selon la méthode décrite à l'annexe 1.

Chez les mères, les analyses métabolomiques ont révélé un grand nombre de métabolites modifiés entre le groupe contrôle et le groupe témoin, majoritairement dans les tissus hépatiques et du cerveau. La plupart d'entre eux suggèrent un dysfonctionnement

[3] Poids du foie exprimé relativement au poids corporel.

mitochondrial associé à une altération du métabolisme énergétique et une modification de l'homéostasie du glucose (augmentations de lipides, acéto-acétate, 3-hydroxybutyrate, glucose, diminutions de glycérol, glycogène, succinate, aspartate, ATP, ADP/AMP, lactate, alanine, glutamate, glutamine). Ces observations évoquent l'induction d'un stress oxydant, hypothèse confortée par les modifications de molécules osmoprotectrices mises en évidence principalement au niveau tissulaire (glutathion, glycine, taurine, phosphocholine, glycérophosphocholine).

Des observations similaires ont été mises en évidence dans le foie des fœtus exposés, de manière plus marquée chez les mâles. Au niveau du cerveau, les modifications sont plus subtiles mais pourraient également évoquer une modification du métabolisme énergétique.

Cet article n'a pas été soumis dans l'attente de résultats complémentaires de lipidomique (les observations faites sur les foies des mères nous ont conduits à envisager des analyses supplémentaires).

A low-dose of a complex pesticide mixture disrupts the metabolome of pregnant rats and their offspring

BONVALLOT NATHALIE (1,2,3), CANLET CECILE (3), BLAS-Y-ESTRADA FLORENCE (3), GAUTHIER ROSELYNE (3), TREMBLAY-FRANCO MARIE (3), CORDIER SYLVAINE (1,4), CRAVEDI JEAN-PIERRE (3)

(1) INSERM UMR1085 IRSET, Rennes, France

(2) EHESP Rennes, Sorbonne Paris Cité, France

(3) INRA UMR 1331 Toxalim; University of Toulouse, INP, ENVT, EIP, UPS, UMR1331, Toulouse, France

(4) University of Rennes I, Rennes, France

Corresponding author

Nathalie Bonvallot

EHESP School of Public Health, Avenue du Professeur Léon Bernard, CS74312, 35043 Rennes Cedex, France. Tel: +332 99 02 26 22. Fax: +332 99 02 26 75. E-mail: nathalie.bonvallot@ehesp.fr

Key-words

Metabolomics, pesticides, low doses, biomarkers, prenatal exposure.

Acknowledgments including grant information

This work was supported by grants from the EHESP-School of Public Health (Young researchers) and the French Ministry of Environment in a national program Grenelle de l'Environnement programme LOLF 189 funding (EXPiOmark). The authors gratefully acknowledge Elisabeth Perdu, Sandrine Bruel, Nicolas Cabaton, Jérôme Molina, Marc Audebert, and Daniel Zalko for their help in tissue sampling. Thanks are also due to Frédéric Mercerand (INRA, Nouzilly) for his contribution to the preparation of the diets.

Competing financial interest's declaration

The authors declare they have no competing financial interests.

Abstract

The use of pesticides leads to the exposure of human beings to numerous molecules. In early-life, such exposures may be responsible of adverse effects in later life. This study aims at assessing the metabolic modifications in pregnant rat and their offspring, induced by a low-dose of pesticide mixture representative of human exposures. Twenty (10 per group) pregnant rats were exposed to a low-dose mixture of 8 pesticides representing the main environmental exposure in Brittany (France) in 2004 (acetochlor, bromoxynil, carbofuran, chlormequat, etephon, fenpropimorph, glyphosate and imidacloprid). Females were fed *ad libitum* from early pregnancy (gestational day GD4) to GD21. Urine samples were collected at GD 15. At the end of the exposure, mothers and pups were euthanized. Blood, liver and brain samples were collected and ^{1}H NMR-based metabolomics analyses were performed. PCA and PLS-DA were used to discriminate control and exposed groups. Significantly modified metabolites were then identified with a Kruskal-Wallis test ($p<0.05$) and matching with databases and report in literature. In dams, the metabolomics analysis reveals a large number of modified metabolites between groups, especially in the liver and brain. The involved metabolites (lipids, aceto-acetate, 3-hydroxybutyrate, ATP, ADP/AMP, alanine, glutamate, aspartate, N-acetylaspartate, succinate and other amino-acids, glucose, glycogen, glycerol, taurine, and glycerophosphocholine) suggest that the pesticide mixture induces an oxidative stress associated with a mitochondrial dysfunction and an impairment of the glucose metabolism. Similar findings are observed for the glucose and energetic metabolism in the liver of the offspring, and an oxidative stress is also suggested in brain offspring. This work shows that a maternal exposure to low-doses of pesticides largely used in France in 2004 is responsible of a metabolic response in offspring involving an oxidative stress, an impairment of the mitochondria, an inflammatory response and a modification of the glucose metabolism. The impact of these modifications later in life should be studied.

Introduction

Pesticides are commonly used products, especially in agriculture. Their uses can lead to environmental contamination and although human exposure is not fully elucidated, numerous studies have shown that the proximity to agricultural pesticide applications may be a source of pesticide exposure in addition to domestic or dietary sources (Ward *et al.* 2006 ; Bradman *et al*. 2011 ; Gunier *et al*. 2011 ; Jamin *et al.* 2014 ; Chevrier *et al.* 2014). Pesticides are considered as a risk factor for human health, particularly in occupational situations where increased risks on cancers, developmental defect or neurologic pathologies have been shown (INSERM, 2013). However in the case of environmental and low-doses exposure to pesticide, such conclusions are more difficult to draw, owing to the complexity of exposure characterization. Fetuses and infants are considered particularly susceptible to toxicants because of the development of the organism until the puberty. A literature analysis reveals that environmental exposures to herbicides (atrazine, metolachlore) during pregnancy may have an impact on fetal growth (decreased body weight) (Chevrier *et al.* 2011 ; Hochoa-Acuna *et al*. 2009) and may induce malformations, especially on the anterior abdominal wall (Mattix *et al*. 2007 ; Waller *et al.* 2010 ; Weselak *et al.* 2008). Growth retardation also seems to be linked with environmental organophosphorous exposures in case of lower activity of paraoxonase 1 (Harley *et al.* 2011). For these insecticides, most of the studies investigated the impact of prenatal exposure on children neurodevelopment during the first years of life. It is reasonable to conclude to a possible negative impact on cognitive development, behavior (attention deficit, hyperactivity), memory, visual acuity and subtle motricity, with the same susceptibility in case of genetic polymorphism linked with paraoxonase I activity (Eskenazi *et al.* 2010 ; Marks *et al.* 2010 ; Ostrea, Jr. *et al.* 2012 ; Rauh *et al.* 2011 ; Rauh *et al.* 2006).

Metabolomics seems a promising approach to study the associations between multiple, low-dose environmental exposure and health effects. Over the last few years, many toxicological

studies demonstrated that metabolomics is a powerful method for detecting changes in the metabolome of exposed individuals to pesticides, usually at doses lower than those that produce histopathological or clinical changes. A recent comprehensive review shows that exposure to pesticides at low-doses, including mixtures, may induce metabolic modifications potentially linked with physiopathological disturbances (Bonvallot *et al*. 2014). In this way, endosulfan, atrazine and chlorpyrifos in combination have the potential to induce changes in amino acids metabolism, citrate cycle, urea cycle and glucose metabolism with an oxidative disturbance in mice (Canlet *et al.* 2013; Demur *et al.* 2013). Rat exposure to organophosphorus mixtures (chlorpyrifos and carbaryl, or dichlorvos, dimethoate, acephate, phorate) induces disturbance in energy and lipids metabolism (Du *et al.* 2013; Wang *et al*. 2009; Wang *et al.* 2011), also observed for organophosphorous alone (Yang *et al.* 2011, 2013; Liang *et al.* 2012a, 2012b, Feng *et al.* 2012; Hao *et al.* 2012; Sun X *et al.* 2014). The energy metabolism was also disturbed by an exposure to pyrethroids (deltamethrin) alone or in combination with dichlorvos (Wang *et al.* 2013). A modification in the urinary metabolic profile of rats exposed to benzimidazole fungicides (carbendazim or thiabendazole), or bipyridyllium herbicides (chlormequat or mepiquat) was also observed at low dose without sign of toxicity (Jones *et al.* 2013). Toxicological studies are usually carried out in conditions which are not representative of human exposures, in particular because they investigate single compounds or simple mixtures. For instance, to our knowledge, only one study has been designed to investigate the metabolic effects of complex mixtures of pesticides representative of human exposure: Mehri et al. investigated the effect in mice of a mixture of low-doses (derived from their respective acceptable daily intakes) of six pesticides frequently found in fruits and vegetables grown in France and showed a metabolic signature linked to oxidative stress and glucose regulation (Merhi et al. 2010).

The objective of this work was to assess the metabolic effects of a complex and low-dose mixture of pesticides at low doses in pregnant rat, representative of an environmental human exposure. In Brittany, more than 60% of the surface area is devoted to agricultural activities, with a large part (50%) of cereal and corn crops. In this region in the 2000's, almost all land areas received at least four different treatments in order to control annual grasses (herbicides), fungus or insects proliferation (fungicides and insecticides). Acetochlor, carbofuran, chlormequat, etephon, fenpropimorph, imidacloprid, glyphosate and bromoxynil alone constituted almost 90% of the quantity of pesticide received on towns' areas.

Material and methods

Chemicals and exposure

The eight high purity (≥ 98%) pesticides (pestanal® analyticl standards) acetochlor, bromoxynil, carbofuran, chlormequat, etephon, fenpropimorph, glyphosate and imidacloprid, were purchased from Fluka, Sigma Aldrich (Germany). They were incorporated into the rat diet at a theoretical dose corresponding to the same proportions that their respective environmental exposure estimated from French uses in 2004, to reach a total dose of 447 µg/kg BW/d, which should not exceed the sum of their respective acceptable daily intake (i.e. 3.6 – 10 – 0.15 – 40 – 30 – 3 – 300 – 60 µg/kg BW/d respectively) (EFSA and Agritox, data from the Decision of the European Union, available respectively at www.efsa.europa.eu and www.agritox.anses.fr). Theoretical and ingested doses calculated from food consumption during the experimentation are given in the Table 1. All exposures are below their known NOAEL/LOAEL used for the derivation of the acceptable daily intake.

Preparation of contaminated diet

Commercial powdered diet formulated for growth, pregnancy and lactation (A03, SAFE) was used for this study. Because the extremely low quantities of pesticides to be added to the diet, we incorporate them first into a premix batch by thoroughly mixing the required quantity of

each pesticide into 50 g powdered diet. Briefly, all pesticides were dissolved in methanol (10 mL total volume) except glyphosate which was dissolved in water (1 mL) and both alcoholic and aqueous solutions were added to the diet. Then, the mixture was homogenized for 15 min using a blender homogenizer. The resulting mix was kept for 24 hours at room temperature to allow methanol and water to evaporate. The mix was then combined with 50 g diet and put in a ball-mill to be reduced to a powder. This premix was stored at 4 °C in glass flasks until mixing and pelleting the diet. The same procedure was used for control diet, except that no pesticide was added to the alcoholic and aqueous solutions. Before pelleting, all the diet ingredients and the premix were mixed for about 20 min into a mixing bowl.

Animals

40 female Wistar Crl:WI(Han) rats were purchased from Charles River Laboratories, France. Rats were mated the day before receiving, which was considered gestational day (GD) 1. Animals were acclimated for 2 days before exposure. Animals were maintained at temperature and light control (21°C ± 2°C, 12-hours light/dark cycle). Mean body weight was 212 g. Females (10 per lot) were fed from GD4 to GD21 with the control diet or the diet contaminated with the different pesticides. Food consumption and body weights were monitored every two days.

At GD13, 8 females per group were placed in metabolic cages and acclimated for 2 days before a 24-hour urine collection on GD15 (the end of the organogenesis).

At GD21, animals were sacrificed by cervical dislocation followed by exsanguination. Blood samples were taken from the facial artery of the dams, added to a glass vial containing heparin, and placed on ice before centrifugation and freezing at -20°C. In the same time, the fetuses were withdrawn from the uterus of the dams for blood recovery. For each individual, the liver (the median lobe for dams, and a pool of 3 entire livers in each litter for male and

female fetuses) and the brain (entire for dams, and a pool of 3 entire brains in each litter for male and female fetuses) were excised, weighed and frozen rapidly in liquid nitrogen.

Metabolomics analyses

Sample preparation: Urine samples: After thawing at room temperature and vortexing, 500 µL of urine were mixed with 200 µL of phosphate buffer (pH 7.39) prepared in D_2O in which was added sodium 3-trimethylsilyl-1-[2,2,3,3,-$^2H_4$]-propionate (TSP, 1mM). The phosphate buffer is used to minimize variations in chemical shift values in the acquired NMR spectra due to pH differences. TSP served as a chemical shift reference and D_2O served as a field-frequency lock for the NMR spectrometer. Each sample was vortexed and centrifuged for 10 min at 8,000 rpm to remove any precipitate. Then, 600 µL aliquots were transferred to standard 5 mm - NMR tubes for analysis. Plasma samples: After thawing at room temperature and vortexing, 200 µL of serum were mixed with 500 µL of D_2O. Each sample was vortexed and centrifuged for 10 min at 8,000 rpm and 600 µL aliquots were transferred to standard 5 mm - NMR tubes for analysis. Liver and brain samples: Extraction procedures were derived from the method described by Waters et al. (Waters et al. 2002). Samples of tissue (liver: 100 mg; whole brain) were homogenized using a Polytron PT2100 in acetonitrile/H_2O (50/50, v/v) containing 0.1% BHT in an ice-water bath. Homogenates were centrifuged at 5,000 g for 10 min at 4°C and the supernatants were removed and lyophilized before being reconstituted in 600 µL D_2O containing 0.25 mM TSP (as a chemical shift reference at 0 ppm). A solution of dichloromethane/methanol (75/25, v/v) was added to the pellets and the extraction was followed by a further centrifugation (5,000 g for 15 min at 4°C). The lipophilic supernatants were removed, dried under a stream of nitrogen, weighted and reconstituted in 600 µl of $CDCl_3$. The reconstituted solutions were transferred to 5 mm NMR tubes.

Spectra acquisition: All 1H NMR spectra were acquired at 300 K on a Bruker Avance DRX-600 operating at 600.13 MHz (Bruker Biospin, Germany) and equipped with an autosampler

and an inverse ^{1}H-^{13}C-^{15}N cryoprobe. For urine samples, ^{1}H NMR spectra were acquired using a standard pulse sequence NOESY to suppress water resonance. A relaxation delay of 2 s and mixing time of 150 ms were used. 256 free induction decays (FIDs) were collected into 32 k data points using a spectral width of 20 ppm with an acquisition time of 1.36 s. For plasma samples and aqueous extracts, ^{1}H NMR spectra were acquired using the Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) spin-echo pulse sequence with pre-saturation, with a total spin-echo delay (2nt) of 240ms to attenuate broad signals from proteins and lipoproteins. A total of 128 transients were collected into 32k data points using a spectral width of 20 ppm, a relaxation delay of 2s and an acquisition time of 1.36s. For lipophilic extracts, a 30° pulse sequence (zg30) was used. A total of 128 transients were collected into 64k data points using a spectral width of 12 ppm, a relaxation delay of 5s and an acquisition time of 4.56s.

^{1}H NMR data preprocessing: All free induction decays were then multiplied by an exponential function with a line broadening factor of 0.3 Hz prior to Fourier transformation. All spectra were referenced to the chemical shift of TSP (δ 0.00). All NMR spectra were phase- and baseline-corrected manually using Topspin (V2.1, Bruker Biospin, Germany) and ACD/NMR Processor (Academic Edition, ACD Labs, Canada). The spectral regions containing residual water, solvents, and urea resonances were removed and spectra were digitized to 469 to 766 buckets (according to the biological media) corresponding to 0.01 ppm intervals using the AMIX software package (V3.9.11, Bruker Biospin, Germany). Each integrated region was divided by the total spectral intensity in order to normalize values. This partially removes concentration differences between samples.

For the lipidic extracts of the pregnant rats (liver and brain), each spectral region corresponding to a specific class of lipids was manually integrated to obtain the composition of the lipid content (saturated and unsaturated fatty acids, w-3 or w-6 group, DHA, EPA and ARA, and cholesterol).

Discriminant analysis on urinary metabolites according to exposure groups: The NMR spectral data were imported into the SIMCA-P+ software package (version 12.0, Umetrics) for multivariate statistical analysis. Principal component analyses (PCA) were performed to separate the exposed group versus the control and remove outliers if necessary. PLS-DA method was then applied to identify potential metabolites corresponding to the buckets with variable importance in the projection (VIP) above 1. Cross-validation was used to determine the number of linear combinations to be included in the PLS-DA model. The quality of the model was given by the two parameters R2Y (proportion of explained variance) and Q2Y (predictive ability). Q2 value was evaluated using a 7-fold cross-validation. A permutation test (200 iterations) was conducted for each PLS-DA model to test for validity.

If no separation was obtained with preliminary PCA or PLS-DA, we used orthogonal signal correction (OSC) filtering in order to decrease variability in X-matrix (spectral data) not correlated with the exposure groups (Eriksson et al. 2006;Wold et al. 1998), that is confounding factors such as physiological, experimental, and instrumental factors.

A non-parametric Kruskal-Wallis test with the critical p-value of 0.05 was further used to determine whether a significant difference of each metabolite obtained from PLS-DA models existed between the two groups of exposure. This test was conducted using the R software (version 2.12.1). Statistically significant changes between the lipid content of liver and brain from the exposed group and the control group were also assessed using a non-parametric Kruskal-Wallis test (n=6 to 10 per group, p-value < 0.05).

Metabolite identification: Spectral assignments were based on matching 1D NMR data to reference spectra in a home-made reference database, as well as with other databases (http://www.bmrb.wisc.edu/metabolomics/; http://www.hmdb.ca/), and reports in literature.

Results

Dam's characteristics are presented in Table 2. Our results do not show any significant differences in body weight, body weight gain, and liver weight (estimated using the weight of the median lobe and considering it represents 40% of the total liver weight according to Madrahimov *et al.* 2006) in exposed dams as compared to the control. A slight but significant increase in diet consumption between treated and control dams were observed but this difference disappears after adjusting on body weight. However, there was a significant decrease in the hepatosomatic index in exposed dams as compared to the control, associated with a significant increase in the mass of lipids per gram of liver. Finally, dam's brain weights were significantly higher in the exposed group but this tendency disappears after adjusting on body weight. Exposure to pesticides results in slight but not significant decrease in the number of offspring per litter, with a significant decrease in the number of female fetuses.

Based on ^{1}H NMR spectra of urine at GD15 in dams, plasma coming from blood samples at GD21, aqueous and lipidic liver and brain extracts after the sacrifice, nearly 40 metabolites characterize the fingerprints from dietary exposures to pesticide mixtures.

Comparison of metabolic profiles of exposed dams versus control dams

Urinary metabolic profiles: A first PCA reveals a chemical shift of citrate, which may be due to a different urinary pH between individuals, although the addition of phosphate buffer. After excluding the spectral regions corresponding to the signals of the citrate's protons (δ 2.51-2.58 ppm and δ 2.65-2.73 ppm), neither preliminary PCA nor PLS-DA separated the exposed group from the control. An OSC filtered PLS-DA model allowed to identify six different metabolites for which significant modifications were confirmed using a Kruskal-Wallis test. Characteristics of modelling were presented in the Table 3. The figure 1a shows the PLS-DA score plot from the ^{1}H NMR urinary metabolic profiles from dams. In the exposed group,

decreases in hippurate, citrulline, creatine, phenylacetylglycine and glutamate, and an increase in 3-hydroxyphenyl propionate were observed. The signals of citrate, analyzed separately, showed a significant increase in the exposed group compared to the control ($p<0.01$). Modified metabolites between groups, trends and their biological involvement were presented in Table 4.

Plasma metabolic profiles: The preliminary PCA reveals an acceptable separation, especially on the second component (figure 1b). The rat n°23 is more distant than the other individuals, because of increased lipid and lactate content. The PLS-DA modelling allowed to identify 11 metabolites significantly modified (increase in lipids, aceto-acetate, decrease in acetate, alanine, glutamine, leucine, isoleucine, valine, methionine, dimethylglycine), suggesting a disturbance of the energy metabolism, amino-acids metabolism and lipids metabolism (see Tables 3, 4). A schematic interpretation of these modifications, both in urine and plasma, is presented in the Figure 3a.

Liver metabolic profiles, aqueous extract: After excluding two individuals with a high content of 3-hydroxybutyrate and an extremely diluted spectra, the PCA shows a very good separation on the first component that explain 44% of the total variability between groups. The first component of a PLS-DA model explains 81.2% of the variability (Table 3). In the exposed group, a significant increase in creatine, glucose, leucine, and glycerophosphocholine was observed, and in a lesser extent (non-significant), acetate and 3-hydroxybutyrate. A concomitant decrease in glutamate, glutamine, glycogen, glycerol, lysine, serine, dimethylgylcine, glycine, and taurine suggests an impact on energy and glucose metabolism, amino-acid metabolism and a potential oxidative stress (Table 4).

Lipidic extract: The PCA does not show any separation between groups (data not shown). The first component of a PLS-DA model explains 53.9% of the variability (Table 3) but none of the signals were significantly different between groups. However, the specific analysis of the

lipid composition of the liver showed a modification in the unsaturated/ saturated fatty acids ratios between groups as it is shown in the Table 5. A lower percentage of unsaturated fatty acid is observed in the exposed group (50% compared to 70%) which is associated with an increase in the percentage of saturated fatty acids (40% compared to 20%). Among the unsaturated fatty acids group, the decrease concerns the monounsaturated fatty acids (MUFA) and the polyunsaturated fatty acids (PUFA) excepted ω3 group, arachidonic acid (ARA) and di-unsaturated ω6 group. These observations may be in accordance with the oxidative stress hypothesis, because unsaturated fatty acids are more sensible to oxidation damages, with their sensitivity increasing as a power function of the number of double bonds.

Brain metabolic profiles: aqueous fraction: After excluding one outlier (which has a singlet at 3.36 ppm and a very concentrated spectra), the PCA properly separates the exposed group from the control, especially on the first component. The PLS-DA modelling followed by a Kruskal-Wallis test allows to identify a significant increase in creatine, N-acetylaspartate, lysine, inosine, oxidized glutathione, taurine, ethanolamine concentrations in brain, and a decrease in lipids, ATP, ADP/AMP, glutamine, aspartate, succinate, lactate, serine, glycerophosphocholine, phosphocholine, and uridine. These observations could be linked with an oxidative stress and are schematically represented in the figure 3b.

Lipidic fraction: Neither PCA nor PLS-DA show any separation between groups (data not shown). After an OSC-filtering (3 components excluded), the first component of the PLS-DA explains 98% of the variability between groups (Table 3). The specific analysis of the lipid composition of the brain does not show any modification in the unsaturated/ saturated fatty acids ratio. However, there is a modification in the composition of unsaturated fatty acids between groups with a decrease in MUFA associated with an increase in di-unsaturated ω-6 fatty acids in the exposed group compared to the control (Table 6).

Comparison of offspring's metabolic profiles at GD21 between exposed versus control groups

Only male blood profiles samples were analyzed due to insufficient quantity of blood collected from female fetuses. Each NMR spectra was acquired from blood collected in a pool of 3 males per litter.

Plasma metabolic profiles: The preliminary PCA (mean-centered data) reveals a good separation, especially on the second component (figure 2a). No outlier was identified. Five metabolites were identified after a PLS-DA modeling. The characteristics of the PLS-DA model are given in the Table 7. The modifications observed include a lower plasmatic level in creatine, glutamate and choline, and a higher plasmatic level of lipids and taurine in exposed fetuses compared to controls (Table 8).

Liver metabolic profiles, aqueous fraction: males and females were analyzed separately. For males, the preliminary PCA reveals 3 outliers (with an excess of glucose for two individuals included in the exposed group and an individual with an excess of glycerophosphocholine in the control group). After excluding them, the PCA correctly separate the exposed group and the control group (figure 2b). Eighteen metabolites are modified between groups after the PLS-DA modeling (Table 7, 8), including decreases in creatine/ creatinine, alanine, glutamate, aspartate, glycogen, glycerol, leucine, valine, methionine, glutathione, and an increase in ATP, ADP/AMP, glucose, lysine (or acetate), taurine, glycerophosphocholine and phosphocholine. These observations suggest a modification in the glucose metabolism potentially associated with a mitochondrial dysfunction. An oxidative stress could be suggested. For females, the results are less informative but a slight separation is observed with the PCA (figure 2c) and the PLS-DA model explains more than 85% of the variability between groups (with a lower Q2 than in males, Table 7). Only 8 metabolites are modified

between groups, including creatine, glutamine, glucose, glycogen, glycerol, lactate, taurine and phosphocholine (Table 8). The same trends were observed than for males.

Brain metabolic profiles: aqueous fraction: males and females were analyzed separately. PLS-DA modelling allows to correctly separate the groups of exposure for both sexes, but in males, an OSC-filtering was necessary (Table 7). Ten metabolites were modified in males according to the group of exposure, including ADP/AMP, succinate, lactate, taurine (increases), and aspartate, N-acetylaspartate, alanine, glutamate, glutamine, and choline (decreases). The same observations were made in females, except for succinate, alanine (no change) and lactate (inverse tendancy). In addition, a decrease in leucine, valine and glycerophosphocholine, and an increase in GABA, lysine, inosine and uridine were observed only in females. These observations suggest an impact on the amino-acid metabolism that may be associated with an oxidative stress.

Lipidic fraction: The analysis of lipidic fraction of the liver and brain are unconvincing (data not shown).

Discussion

Our results show that an exposure to a low-dose of a mixture of 8 pesticides during the pregnancy may alter the energetic metabolism, amino acids as well as the metabolism of glucose and lipids. Pesticides were chosen to be representative of the potential environmental exposure of people residing in Brittany, France, where a large part of the surface area is devoted to cereal and corn crops. The 8 pesticides correspond to the more commonly used active substances, representing 90% of the uses on cereal and corn crops. The total exposure (around 450 µg/kg bw/d) was chosen to be equal to the sum of their respective ADI and each proportion was then calculated to represent the French uses (a large proportion for acetochlor

and to a lesser extent, carbofuran, chlormequat, etephon, and a low proportion for bromoxynil, fenpropimorphe, glyphosate and imidacloprid).

Thirty-nine metabolites were modified in exposed group compared to control group, both in dams and pups. Hippurate, 3-hydroxyphenylpropionate and phenylacetylglycine are involved in the metabolism of the gut microflora (Nicholson et al. 2005). The changes observed in the excretion of these co-metabolites in dams (reduced urinary excretion of hippurate and phenylacetylglycine, increased urinary excretion of 3-hydroxyphenylpropionate) may be associated with an impact on gut microflora functions. The modification of these functions may be due to an increase in nitrogen compounds inducing a concomitant enhancement of the urea cycle (increase in the excretion of urinary citrulline). The decrease in phenylacetylglycine may also indicate a disruption in fatty acid metabolism.

A suggestion of modified metabolic pathways is presented in the figures 3 (dams) and 4 (offspring). Alanine is a non-essential amino acid functioning as a major energy source and a regulator in glucose metabolism. Glutamate is a key amino acid in the cellular metabolism. It is involved in the glutathione metabolism and is also an excitatory neurotransmitter having a role in synaptic plasticity (associated with neurocognitive functions). Glutamine is used to maintain the store of amino-acids in the organism and is formed from glutamate. The decrease in alanine levels (plasmatic levels in dams and liver and brain levels in pups) associated with a decrease in glutamate and glutamine may suggest impairment in the neoglucogenesis in the liver, associated with a dysfunction of the TCA cycle as indicated in the figure 3. This hypothesis is strengthened by a decrease in both glycogen and glycerol (precursors of glucose) and an increase in glucose levels observed in the liver of dams and pups. Furthermore, the concomitant increase in lactate in the liver and brain of pups supports the hypothesis of an alteration of the energy metabolism: the enhancement in anaerobic metabolism is an alternative way to stimulate glycolysis by transferring electron and

maintaining a steady state condition in the cell when the TCA cycle is disturbed (Verwaest *et al*. 2011). These observations are in agreement with a disturbance in the glucose/ energetic metabolism in the liver. It could be noted that such impairment has already been highlighted after exposures to organophosphorous alone (Liang *et al.* 2012a, 2012b) or organophosphorus mixture (Du *et al*. 2013).

The branched chain amino acids are the main nitrogen source for glutamine and alanine syntheses in the muscle and decreases in leucine, isoleucine and valine observed in the plasma of dams, the liver of pups and the brain of female pups are consistent with the decrease in alanine levels. These branched chain amino acids are involved in stress and energy metabolism, and leucine and isoleucine have an important role in fatty acids synthesis. It could be suggested that the decrease observed in our study are associated with the increase in plasmatic lipids in all exposed animals compared to the control groups. Similar findings were found in rodents orally exposed to pesticide alone or in mixtures (mice orally exposed to endosulfan, atrazine and chlorpyrifos to their respective ADI (Demur *et al.* 2013), rats orally exposed to chlorpyrifos and carbaryl (Wang *et al.* 2011), propoxur alone (Liang *et al.* 2012a, 2012b), dimethoate alone (Feng *et al*. 2012) or a mixture of 4 organophosphorus pesticides (Du *et al.* 2013)).

Based on the increase in the concentrations of aceto-acetate in the liver in exposed dams, and the non-significant increases in 3-hydroxybutyrate and acetate, we can also hypothesized an enhancement of the beta-oxidation of fatty acids in response to the disruption of the TCA cycle. This switch in the energy metabolism from glycolysis to beta-oxidation was recently shown when rats were orally exposed to pyrethroids, and associated with hepatotoxicity and nephrotoxicity (Liang *et al*. 2013).

Glycine and glutathione are cytoprotective agents involved in ROS scavenging (Petrat *et al.* 2012). Taurine is a stabilizer of cell membranes. Glycerophosphocholine (GPC) is also an

osmoprotective compound which has been found to be essential for the structural integrity of cell membranes (Klein 2000). An increase of GPC concentrations to protect cell damage could be induced by hypertonic conditions themselves generated by the oxidative stress as it was shown in case of liver damage (Zhang *et al.* 2011). Choline is a precursor of acetylcholine as a methyl donor in various metabolic processes including lipid metabolism. Choline entering the cells was rapidly phosphorylated to phosphocholine or oxidized to betaine (Pritchard and Vance 1981). It is also involved in amino acid metabolism (glycine, serine, and threonine). According to previous data showing ROS generation after exposure to organophosphorous, organochlorine or pyrethroid pesticides (Lee *et al.* 2012; Li *et al.* 2011; Pathak *et al.* 2011), metabolic modifications observed in our study may be associated with an impairment of membrane functions associated with an oxidative stress, and linked with the mitochondrial dysfunction. Indeed, we also observed an impairment in the unsaturated/ saturated fatty acids ratio in the liver of exposed dams with a decrease in the proportion of unsaturated fatty acids (table 5), which may be explained by their higher sensitivity to lipid peroxidation.

In brain, the decrease in alanine, glutamine, glutamate and branched-chain amino acids are in accordance with the alteration of the energetic metabolism and TCA cycle. The hypothesis of an oxidative stress may also be suggested based on the increases in taurine levels both in dams and offspring (associated with an increase in oxidized glutathione only in dams). The decrease in ATP observed in dams could be a consequence of a mitochondrial dysfunction. The inhibition of ATP synthesis was experimentally observed after exposures to different organophosphorous insecticides, including monocrotophos, parathion, dichlorvos, metaphos, malathion and chlorpyrifos, as it was recently reviewed (Karami-Mohajeri and Abdollahi 2013). The depletion of intracellular ATP may be responsible of a decrease in the activity of membrane channels (ATP-sensitive potassium channels) leading to a membrane

depolarization. The concomitant decrease in glutamate levels may lead to the opening of the N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptors, leading to an alteration of the neuron homeostasis (entry of calcium, apoptosis). Surprisingly in offspring, the modifications in ATP levels are in an opposite way. In addition in brain's offspring, we observed an increase in ATP associated with an increase in GABA. These observations should be confirmed by other experimental studies to understand whether it is a direct effect associated with the pesticide exposure or a compensatory mechanism resulting from the metabolic modifications observed in mothers. It appears essential to clarify this mechanism since changes in the glutamate/ GABA balance promote neuronal apoptosis (Gao *et al.* 2014).

In conclusion, these observations suggest that the exposure of the mixture to 8 pesticides commonly used in agriculture gives rise to oxygen containing free radicals, explaining a peroxidation of sensitive unsaturated lipids of the cell membranes in the liver of dams and pups. Production of ROS may induce a stress in the endoplasmic reticulum leading to an inflammation process responsible to a compensatory response on glucose metabolism and circulating lipids. The analyses of brain tissue extracts suggest an impact on amino-acid and energy metabolisms. Finally, our observations are relatively similar to other published works which have investigated the exposure of different types of pesticides (organophosphorous, carbamates, organochlorines, pyrethroids, alone or in mixture). These observations may be in favour of a unique signature characterizing the pesticide exposure accounting for a common adaptive phenomenon in exposed animals. If a clear conclusion cannot be drawn in dams, it cannot be excluded that the modifications observed in pups (both in the liver and brain) may lead to an adverse impact later in life (metabolic disorders, neurologic effects). By the way, some toxicological studies showed an hepatotoxicity or a nephrotoxicity associated with the metabolic modifications. It should be studied in future works.

References

Boehm G, Cervantes H, Georgi G, Jelinek J, Sawatzki G, Wermuth B, et al. 1998. Effect of Increasing Dietary Threonine Intakes on Amino Acid Metabolism of the Central Nervous System and Peripheral Tissues in Growing Rats. Pediatr Res 44: 900-906.

Bonvallot N, Tremblay-Franco M, Chevrier C, Canlet C, Debrauwer L, Cravedi JP, et al. 2014. Potential input from metabolomics for exploring and understanding the links between environment and health. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews Accepted.

Bradman A, Castorina R, Boyd Barr D, Chevrier J, Harnly ME, Eisen EA, et al. 2011. Determinants of Organophosphorus Pesticide Urinary Metabolite Levels in Young Children Living in an Agricultural Community. International Journal of Environmental Research and Public Health 8: 1061-1083.

Canlet C, Tremblay-Franco M, Gautier R, Molina J, Métais B, Blas-Y-Estrada F, et al. 2013. Specific Metabolic Fingerprint of a Dietary Exposure to a Very Low Dose of Endosulfan. J Toxicol 545802.

Chevrier C, Limon G, Monfort C, Rouget F, Garlantezec R, Petit C, et al. 2011. Urinary Biomarkers of Prenatal Atrazine Exposure and Adverse Birth Outcomes in the PELAGIE Birth Cohort. Environmental Health Perspective 119: 1034-1041.

Chevrier C, Serrano T, Lecerf R, Limon G, Petit C, Monfort C, Hubert-Moy L, Durand G, Cordier S. 2014. Environmental determinants of the urinary concentrations of herbicides during pregnancy: the PELAGIE mother-child cohort (France). Environ Int. 2014;63:11-18.

Demur C, Métais B, Canlet C, Tremblay-Franco M, Gautier R, Blas YE, et al. 2013. Dietary exposure to a low dose of pesticides alone or as a mixture: the biological metabolic fingerprint and impact on hematopoiesis. Toxicology 308: 74-87.

Du L, Wang H, Xu W, Zeng Y, Hou Y, Zhang Y, et al. 2013. Application of Ultraperformance Liquid Chromatography/Mass SpectrometryGÇôBased Metabonomic Techniques to Analyze the Joint Toxic Action of Long-term Low-Level Exposure to a Mixture of Organophosphate Pesticides on Rat Urine Profile. Toxicological Sciences.

Ellis J, Athersuch T, Thomas L, Teichert F, Perez-Trujillo M, Svendsen C, et al. 2012. Metabolic profiling detects early effects of environmental and lifestyle exposure to cadmium in a human population. BMC Medicine 10: 61.

Eriksson L, Johansson E, Kettaneh-Wold N, Trygg J, Wikstrom C, Wold S. 2006. Multi- and Megavariate data Analysis Part I. basic Principles and Applications. Second revised and enlarged edition ed.

Eskenazi B, Huen K, Marks A, Harley KG, Bradman A, Barr DB, et al. 2010. PON1 and neurodevelopment in children from the CHAMACOS study exposed to organophosphate pesticides in utero. Environ Health Perspect 118: 1775-1781.

Feng Z, Sun X, Yang J, Hao D, Du L, Wang H, et al. 2012. Metabonomics analysis of urine and plasma from rats given long-term and low-dose dimethoate by ultra-performance liquid chromatographyGÇômass spectrometry. Chemico-Biological Interactions 199: 143-153.

Gao J, Wang H, Liu Y, Li Y-Y, Chen C, Liu L-M, Wu Y-M, Li S, Yang C. Glutamate and GABA imbalance promotes neuronal apoptosis in hippocampus after stress. 2014. Med Sci Monit 20:499-512.

Gunier RB, Ward MH, Airola M, Bell EM, Colt J, Nishioka M, et al. 2011. Determinants of agricultural pesticide concentrations in carpet dust. Environ Health Perspect 119: 970-976.

Hao D.F, Xu W, Wang H, Du L.F, Yang J.D, Zhao X.J, et al. 2012. Metabolomic analysis of the toxic effect of chronic low-dose exposure to acephate on rats using ultra-performance liquid chromatography/mass spectrometry. Ecotoxicol Environ Saf. 83:25-33.

Harley KG, Huen K, Aguilar SR, Holland NT, Bradman A, Barr DB, et al. 2011. Association of organophosphate pesticide exposure and paraoxonase with birth outcome in Mexican-American women. PLoS ONE 6: e23923.

Hochoa-Acuna H, Frankenberger J, Leighanne H, Carbajo C. 2009. Drinking-Water Herbicide Exposure in Indiana and Prevalence of Small-for-Gestational-Age and Preterm Delivery. Environmental Health Perspectives 117: 1619-1624.

INSERM. 2013. Pesticides, effets sur la santé. Expertise collective. Editions INSERM. Paris.

Jamin E, Bonvallot N., Tremblay-Franco M, Cravedi JP, Chevrier C, Cordier S, et al. 2014. Untargeted profiling of pesticide metabolites by LC-HRMS: an exposomics tool for human exposure evaluation. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 406:1149-1161.

Jones OA, Murfitt S, Svendsen C, Turk A, Turk H, Spurgeon DJ, Walker LA, Shore RF, Long SM, Griffin JL. Comparisons of metabolic and physiological changes in rats following short term oral dosing with pesticides commonly found in food. Food and Chemical Toxicology. 2013;59:438-445.

Karami-Mohajeri S, Abdollahi M. 2013. Mitochondrial dysfunction and organophosphorus compounds. Toxicology and Applied Pharmacology 270:39-44.

Klein J. 2000. Membrane breakdown in acute and chronic neurodegeneration: focus on choline-containing phospholipids. Journal of Neural Transmission 107: 1027-1063.

Kuo CH, Wang KC, Tian TF, Tsai MH, Chiung YM, Hsiech CM, et al. 2012. Metabolomic characterization of laborers exposed to welding fumes. Chem Res Toxicol 25: 676-686.

Lee JE, Park JH, Shin IC, Koh HC. 2012. Reactive oxygen species regulated mitochondria-mediated apoptosis in PC12 cells exposed to chlorpyrifos. Toxicol Appl Pharmacol DOI 10.1016/j.taap.2012.06.005. Available online 16 June 2012.

Li HY, Wu SY, Ma Q, Shi N. 2011. The pesticide deltamethrin increases free radical production and promotes nuclear translocation of the stress response transcription factor Nrf2 in rat brain. Toxicology and Industrial Health 27: 579-590.

Liang YJ, Wang HP, Long DX, Wu YJ. 2012a. (1)H NMR-based metabonomic profiling of rat serum and urine to characterize the subacute effects of carbamate insecticide propoxur. Biomarkers 17: 566-574.

Liang YJ, Wang HP, Long DX, Wu YJ. 2012b. Applying biofluid metabonomic techniques to analyze the combined subchronic toxicity of propoxur and permethrin in rats. Bioanalysis 4: 2897-2907.

Liang YJ, Wang HP, Long DX, Li W, Wu YJ. 2013. A metabonomic investigation of the effects of 60 days exposure of rats to two types of pyrethroid insecticides. Chem Biol Interact. 206(2):302-308.

Madrahimov N, Dirsch O, Broelsch C, Dahmen U. Marginal hepatectomy in the rat: from anatomy to surgery. Ann Surg 2006;244:89–98.

Marks AR, Harley K, Bradman A, Kogut K, Barr DB, Johnson C, et al. 2010. Organophosphate Pesticide Exposure and Attention in Young Mexican-American Children: The CHAMACOS Study. Environ Health Perspect 118.

Mattix KD, Winchester PD, Scherer LR. 2007. Incidence of abdominal wall defects is related to surface water atrazine and nitrate levels. J Pediatr Surg 42: 947-949.

Merhi M, Demur C, Racaud-Sultan C, Bertrand J, Canlet C, Estrada FB, et al. 2010. Gender-linked haematopoietic and metabolic disturbances induced by a pesticide mixture administered at low dose to mice. Toxicology 267: 80-90.

Nicholson JK, Holmes E, Wilson ID. 2005. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. Nature Reviews Microbiology 3: 431-438.

Ostrea EM, Jr., Reyes A, Villanueva-Uy E, Pacifico R, Benitez B, Ramos E, et al. 2012. Fetal exposure to propoxur and abnormal child neurodevelopment at 2 years of age. NeuroToxicology 33: 669-675.

Pathak R, Mustafa MD, Ahmed T, Ahmed R, Tripathi AK, Guleria K, et al. 2011. Intra uterine growth retardation: Association with organochlorine pesticide residue levels and oxidative stress markers. Reproductive Toxicology 31: 534-539.

Petrat F, Boengler K, Schulz R, de Groot H. 2012. Glycine, a simple physiological compound protecting by yet puzzling mechanism(s) against ischaemia-reperfusion injury: current knowledge. British Journal of Pharmacology 165: 2059-2072.

Pritchard PH, Vance DE. 1981. Choline metabolism and phosphatidylcholine biosynthesis in cultured rat hepatocytes. Biochemical Journal 196: 261-267.

Rauh V, Arunajadai S, Horton M, Perera F, Hoepner L, Barr DB, et al. 2011. Seven-year neurodevelopmental scores and prenatal exposure to chlorpyrifos, a common agricultural pesticide. Environ Health Perspect 119: 1196-1201.

Rauh VA, Garfinkel R, Perera FP, Andrews HF, Hoepner L, Barr DB, et al. 2006. Impact of prenatal chlorpyrifos exposure on neurodevelopment in the first 3 years of life among inner-city children. Pediatrics 118: e1845-e1859.

Sun X, Xu W, Zeng Y, Hou Y, Guo L, Zhao X, et al. 2014. Metabonomics evaluation of urine from rats administered with phorate under long-term and low-level exposure by ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry. J Appl Toxicol 34(2):176-183.

Verwaest KA, Vu TN, Laukens K, Clemens LE, Nguyen HP, Van Gasse B, et al. 2011. 1H NMR based metabolomics of CSF and blood serum: A metabolic profile for a transgenic rat

model of Huntington disease. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease 1812: 1371-1379.

Waller SA, Paul K, Peterson SE, Hitti JE. 2010. Agricultural-related chemical exposures, season of conception, and risk of gastroschisis in Washington State. Am J Obstet Gynecol 202: 241-246.

Wang HP, Liang YJ, Long DX, Chen JX, Hou WY, Wu YJ. 2009. Metabolic Profiles of Serum from Rats after Subchronic Exposure to Chlorpyrifos and Carbaryl. Chem Res Toxicol 22: 1026-1033.

Wang HP, Liang YJ, Sun YJ, Chen JX, Hou WY, Long DX, et al. 2013. 1H NMR-based metabonomic analysis of the serum and urine of rats following subchronic exposure to dichlorvos, deltamethrin, or a combination of these two pesticides. Chemico-Biological Interactions 203: 588-596.

Wang HP, Liang YJ, Zhang Q, Long DX, Li W, Li L, et al. 2011. Changes in metabolic profiles of urine from rats following chronic exposure to anticholinesterase pesticides. Pesticide Biochemistry and Physiology 101: 232-239.

Ward MH, Lubin J, Giglierano J, Colt JS, Wolter C, Bekiroglu N, et al. 2006. Proximity to Crops and Residential Exposure to Agricultural Herbicides in Iowa. Environ Health Perspect 114.

Waters NJ, Holmes E, Waterfield CJ, Farrant RD, Nicholson JK. 2002. NMR and pattern recognition studies on liver extracts and intact livers from rats treated with alpha-naphthylisothiocyanate. Biochemical Pharmacology 64: 67-77.

Weselak M, Arbuckle TE, Wigle DT, Walker MC, Krewski D. 2008. Pre- and post-conception pesticide exposure and the risk of birth defects in an Ontario farm population. Reproductive Toxicology 25: 472-480.

Wold S, Antti H, Lindgren F, Ohman J. 1998. Orthogonal signal correction of near-infrared spectra. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 44: 175-185.

Yang J, Wang H, Xu W, Hao D, Du L, Zhao X, et al. 2013. Metabolomic analysis of rat plasma following chronic low-dose exposure to dichlorvos. Hum Exp Toxicol 32: 196-205.

Yang J, Sun X, Feng Z, Hao D, Wang M, Zhao X, et al. 2011. Metabolomic analysis of the toxic effects of chronic exposure to low-level dichlorvos on rats using ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry. Toxicology Letters 206: 306-313.

Zhang L, Ye Y, An Y, Tian Y, Wang Y, Tang H. 2011. Systems Responses of Rats to Aflatoxin B1 Exposure Revealed with Metabonomic Changes in Multiple Biological Matrices. Journal Of Proteome Research 10: 614-623.

Table 1: Ingested doses of dams to the 8 pesticides (µg/ kg Body Weight/ day)

Pesticide	Proportion of environmental pesticide exposure in Brittany (%)	NOAEL (or LOAEL*) used for the derivation of the ADI	Theoretical oral doses based on French exposures	**Really ingested doses based on food consumption**
TOTAL DOSE			447	**378**
Acetochlor	*64.83*	*1080**	*290*	***246***
Bromoxynil	*3.16*	*1000*	*14*	***12.0***
Carbofuran	*6.03*	*30**	*27*	***22.5***
Chlormequat	*9.33*	*4000*	*42*	***35.0***
Etephon	*6.03*	*27000*	*27*	***22.5***
Fenpropimorph	*4.02*	*300*	*18*	***15.5***
Glyphosate	*3.17*	*31000*	*14*	***12.0***
Imidacloprid	*3.43*	*3700*	*15*	***12.5***

Table 2: Characteristics of pregnant rats (diet consumption, body and organ weights, lipid content and number of offspring per litter) orally exposed to 8 pesticides during the gestation

Parameters (mean, [range])	**Control group**	**Exposed group**
Diet consumption (g)	294.28 [263.3-325.1]	317.17 [261.6-387.0]
Relative diet consumption/ body weight	1.43 [1.26-1.56]	1.47 [1.32-1.72]
Body weight gain (g)	97.5 [87-109]	95.5 [82-119]
Body weight at GD21 (g)	302.7 [282-320]	312.2 [281-343]
Liver weight in dams (g)[a]	9.52 [9.06-10.45]	9.02 [7.98-10.88]
Hepatosomatic index in dams (%)	**3.14 [2.78-3.45]**	**2.88 [2.56-3.17]***
Lipids mass per gram of liver	**26.20 [19.05-32.80]**	**33.77 [25.44-42.10]***
Brain weight in dams (g)	**1.44 [1.22-1.86]**	**1.57 [1.47-1.66]***
Relative brain/ body weight in dams	0.476 [0.428-0.614]	0.503 [0.459 -
Number of offspring per litter	11.39 [8-14]	10.28 [8-13]
Number of males	5.71 [4-7]	5.47 [2-8]
Number of females	**5.53 [3-7]**	**4.20 [3-8]***

[*] *Kruksal Wallis test, significance threshold <0.05;*

[a] *Liver weights were estimated using the weight of the median lobe and considering it represents 40% of the total liver weight (Madrahimov et al. 2006);* [b]*pool of 3 individuals per litter*

Table 3: Results of the partial least square modelling of metabolic profiles of dams (urine, plasma, liver and brain tissue extracts)

Samples	Number of rats	Model	Number of latent variables	R2	Q2	Intercepts[1]	Number of VIP > 1
Urine	15	OSC-pareto scaled + PLS-DA (mean centered)[2]	2	94.8%	0.613	R2=(0.0, 0.665) Q2=(0.0, -0.249)	163
Plasma	20	PLS-DA (pareto scaled)	3	80.6%	0.413	R2=(0.0, -0.472) Q2=(0.0, -0.232)	155
Liver – aqueous	14	PLS-DA (pareto scaled)[3]	1	81.2%	0.704	R2=(0.0, -0.277) Q2=(0.0, -0.222)	87
Liver – lipidic	16	PLS-DA (mean centered)[4]	1	53.9%	0.242	R2=(0.0, 0.0753) Q2=(0.0, -0.108)	18
Brain – aqueous	19	PLS-DA (pareto scaled)[5]	2	86.5%	0.552	R2=(0.0, 0.514) Q2=(0.0, -0.231)	165
Brain – lipidic	20	OSC-pareto scaled + PLS-DA (mean centered)	1	98%	0.974	R2=(0.0, 0.14) Q2=(0.0, -0.239)	38

[1] 200 permutations; [2] exclusion of the citrate's region (shift) and rat n°G2-18 (outlier in a preliminary PCA); [3] exclusion of rats n°G2-17 and G0Mbis; [4] exclusion of the water's region (1.7-2.1ppm) [5] exclusion of rat n°G2-Mter.

Table 4: Metabolites that are significantly different in dams in exposed group compared to control group.

	Urine (GD15)	Plasma	Liver (aqueous)	Brain (aqueous)	Biological involvement
Hippurate	↘				Gut microbial metabolism
3-hydroxy-phenylpropionate	↗				Gut microbial metabolism
Citrulline	↘				Urea cycle
Creatine	↘		↗	↗ [c]	Amino-acid synthesized, storage of energy (phosphocreatine)
Phenylacetylglycine	↘				Minor metabolites of fatty acids
Citrate	↗				TCA cycle
Succinate				↘	TCA cycle
ATP				↘	Energy source
ADP/AMP				↘	Energy source
Glycerol			↘		Component of lipids, converted to glucose for energy production
Glycogen			↘		Energy storage
Glucose			↗		Energy source
Lactate				↘	Energetic metabolism
Alanine		↘			Energy source, glucose metabolism regulator
Glutamate	↘		↘ [b]		Neoglucogenesis, excitatory neurotransmitter
Glutamine		↘	↘	↘	Non-essential amino-acid, role in TCA cycle
Valine		↘			Essential amino-acid involved in stress, energy and muscle metabolism, role in carbohydrate synthesis
Acetate		↘	↗ [a]		Lipid and carbohydrate metabolism
Lipids		↗		↘	Lipid metabolism
Aceto-acetate		↗			Lipid metabolism, cholesterol syntesis
3-hydroxybutyrate			↗ [a]		Lipid metabolism. Energy source
Leucine		↘	↗		Essential amino-acid involved in stress, energy and muscle metabolism, role in cholesterol synthesis
Isoleucine		↘			" "
Lysine		↘	↘ [b]	↗	Essential amino-acid involved in stress, precursor of acetyl-coA
Serine			↘	↘	Non-essential amino-acid derived from glycine
Methionine		↘			Essential amino-acid, catabolism of betaine, precursor for cysteine
Dimethylgylcine		↘	↘		Byproduct of homocysteine and glycine metabolism
Inosine				↗	Purine metabolism
Aspartate				↘	Non-essential amino-acid produced from glutamate, neurotransmitter.
N-acetylaspartate				↗	Neuronal osmolyte, lipid synthesis, derived from aspartate in brain
Oxidized gluthatione				↗	Anti-oxidant
Glycine			↘		Osmoprotector, defense mechanisms
Taurine	↘		↘	↗	Membranes stabilizer in brain, antioxidant, osmolyte
Glycero-phosphocholine			↗	↘	Membranes stabilizer, osmolyte
Phosphocholine				↘	Membranes stabilizer, osmolyte
Ethanolamine				↗	Membran phospholipids synthesis
Uridine				↘	Nucleoside, synthesis of RNA membrane, regulation of physiological processes

[a] no statistical significance; [b] close to the signal of glutamine; [c] with phosphocréatine

Table 5: Comparison of the composition of lipids in the liver of dams between the exposed group and the control group.

Lipid concerned	Median of the percentage (SD)		p-value*
	Control group	Exposed Group	
Saturated fatty acids	**20.0931 (17.4568)**	**43.2430 (18.5369)**	**0,046**
Unsaturated fatty acids	**70.0789 (17.4568)**	**50.3463 (18.5369)**	**0,046**
Unsaturated fatty acids w-3	6.9602 (1.5654)	6.6793 (0.7946)	0,5286
Unsaturated fatty acids, except w-3	**62.4549 (17.9946)**	**43.2076 (18.3762)**	**0,03569**
Mono-unsaturated fatty acids	**55.8004 (18.7829)**	**37.1403 (18.7546)**	**0,03569**
Di-unsaturated fatty acids w-6	5.8430 (1.4913)	5.3354 (0.9964)	0,4008
Docosahexanoïc acid (DHA)	4.9497 (1.3596)	4.4035 (0.5774)	0,4008
Eicosapentaénoïc acid (EPA) & arachidonic acid (ARA)	4.5709 (0.9338)	3.9346 (0.4680)	0,1415
Cholesterol	0.0804 (0.0199)	0.0779 (0.0275)	1

* Kruskal-Wallis test, $p<0.05$

Table 6: Comparison of the composition of lipids in the brain of dams between the exposed group and the control group.

Lipid concerned	Median of the percentage % (SD)		p-value*
	Control group	Exposed Group	
Saturated fatty acids	11.5404 (3.8257)	10.4861 (3.6018)	0.5286
Unsaturated fatty acids	87.7636 (3.8257)	88.8992 (3.6018)	0.5286
Unsaturated fatty acids w-3	17.6856 (3.2872)	19.9669 (3.4637)	0.1722
Unsaturated fatty acids, except w-3	69.7097 (5.0072)	68.5490 (5.0029)	0.5995
Mono-unsaturated fatty acids	**20.7763 (8.2951)**	**11.2009 (4.7928)**	**0.006323**
Di-unsaturated fatty acids w-6	**47.4136 (6.2867)**	**56.3757 (4.3005)**	**0.01172**
Docosahexanoïc acid (DHA)	5.6253 (0.2783)	5.9596 (0.3207)	0.09289
Eicosapentaénoïc acid (EPA) & arachidonic acid (ARA)	7.9904 (1.5662)	7.2212 (0.4514)	0.3446
Cholesterol	3.5618 (1.4090)	3.7458 (1.2332)	0.9164

* Kruskal-Wallis test, $p<0.05$

Table 7: Results of the partial least square modelling of metabolic profiles of offspring (plasma, liver and brain tissue extracts)

Samples	Number of rats (pool of 3)	Model used	Number of latent variable	R2	Q2	Intercepts[1]	Number of VIP > 1
Plasma	13	PLS-DA (mean-centered)	4	98.1%	0.827	R2=(0.0, 0.753) Q2=(0.0, -0.197)	65
Males liver – aqueous	15	PLS-DA (pareto scaled)[2]	1	77.2%	0.631	R2=(0.0, 0.353) Q2=(0.0, -0.17)	123
Females liver – aqueous	20	PLS-DA (pareto scaled)	3	85.1%	0.474	R2=(0.0, 0.461) Q2=(0.0, -0.273)	78
Males brain – aqueous	17	OSC-mean centered + PLS-DA (mean centered)[3]	2	87.2%	0.668	R2=(0.0, 0.364) Q2=(0.0, -0.295)	48
Females brain – aqueous	20	PLS-DA (pareto scaled)	4	98.7%	0.783	R2=(0.0, 0.837) Q2=(0.0, -0.367)	147

[1] 200 permutations; [2] exclusion of rats n°G2-m-bis, G2-m-ter et G0-47; [3] exclusion of rats n°G0-43, G0-mter et G0-mbis (higher levels of choline, lower levels of alanine).

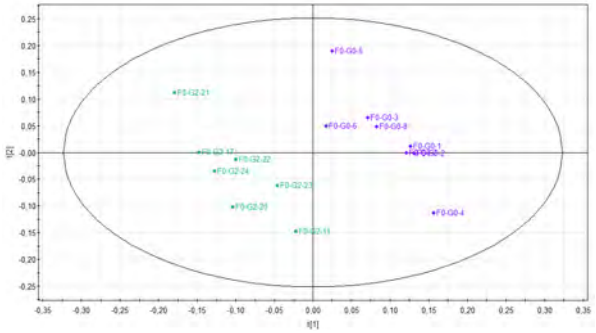
Table 8: Metabolites that are significantly different in offspring from exposed dams compared to non-exposed dams.

Metabolite	Plasma ♂	Aqueous Liver ♂	Aqueous Liver ♀	Aqueous Brain ♂	Aqueous Brain ♀
Creatine	↘	↘[c]	↘		
Lipids	↗				
Acetate		↗[b]			
ATP		↗			↗
ADP/AMP		↗		↗	↗
GABA					↗
Aspartate		↘		↘	↘
Succinate				↗	
N-acetylaspartate				↘	↘
Alanine		↘		↘	
Glutamate	↘	↘		↘	↘
Glutamine			↗	↘	↘
Glucose		↗	↗		
Glycogen		↘	↘		
Glycerol		↘	↘		
Lactate			↗	↗	↘
Leucine		↘			↘
Lysine		↗[b]			↗
Valine		↘			↘
Methionine		↘			
Inosine					↗
Oxidized glutathione		↘			
Taurine	↗	↗	↗	↗	↗
Glycerophosphocholine		↗[a]			↘
Phosphocholine		↗	↗		
Choline	↘			↘	
Uridine					↗

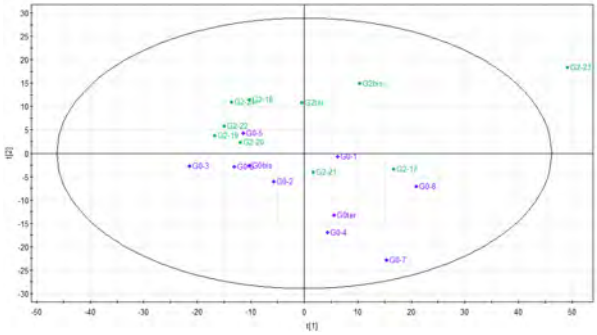
[a] *no statistical significance;* [b] *increase in both lysine and acetate;* [c] *with creatinine*

Figure 1: PLS-DA and PCA score plots from the ^{1}H NMR metabolic profiles of the pregnant rats. The score plot is the projection of the observations onto the first two latent variables. It is colored according to the exposure group. Purple: control, green: group exposed to 8 pesticides largely used in Brittany (France) in 2004 (acetochlor, bromoxynil, carbofuran, chlormequat, etephon, fenpropimorph, glyphosate, imidacloprid).

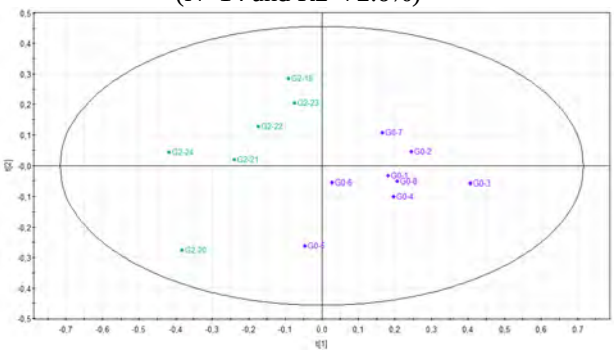
1a. Urine at gestational day 15. The PLS-DA model, constructed on OSC-filtered and mean-centered data (after excluding one outlier and citrate regions), includes 2 latent variables (N=15, R2=94.8% and Q2=0.613)



1b. Plasma at gestational day 21. The PCA model constructed on unit-variance scaled data includes 4 principal components (N=20 and R2=72.5%)



1c. Liver aqueous extract at gestational day 21. The PCA model constructed on Pareto-scaled data (after excluding 2 outliers) includes 3 principal components (N=14 and R2=72.6%)



1d. Brain aqueous extract at gestational day 21. The PCA model constructed on Pareto-scaled data (after excluding 1 outlier) includes 4 principal components (N=19 and R2=72.8%)

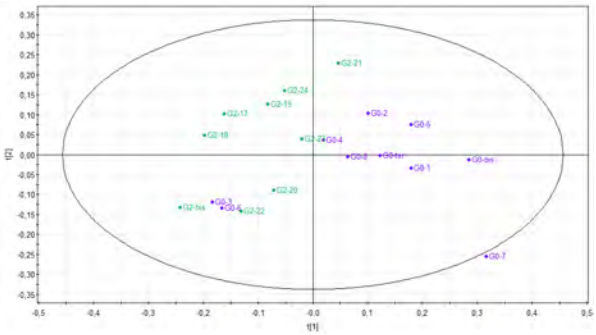
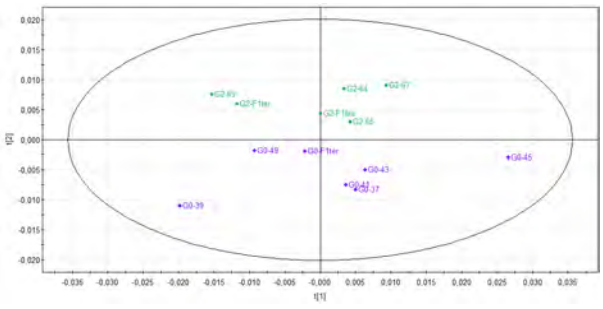
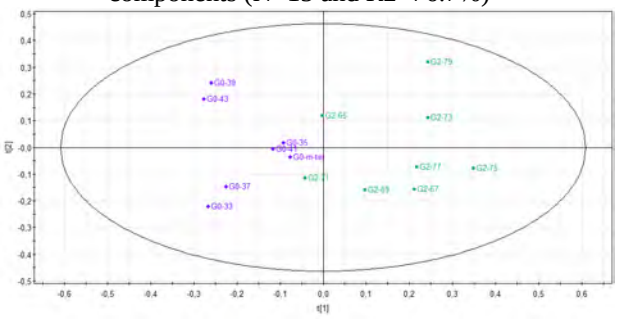


Figure 2: PCA score plots from the ^{1}H NMR metabolic profiles of the offspring (plasma and aqueous extracts of the liver). The score plot is the projection of the observations onto the first two latent variables. It is colored according to the exposure group. Purple: control, green: group in which dams were exposed to 8 pesticides largely used in Brittany (France) in 2004 (acetochlor, bromoxynil, carbofuran, chlormequat, etephon, fenpropimorph, glyphosate, imidacloprid).

2a. Plasma at gestational day 21. The PCA model constructed on mean-centered data includes 3 principal components (N=13 and R2=66.6%)



2b. Male's liver aqueous extract at gestational day 21. The PCA model constructed on Pareto-scaled data (after excluding 3 outliers) includes 4 principal components (N=15 and R2=76.7%)



2c. Female's liver aqueous extract at gestational day 21. The PCA model constructed on Pareto-scaled data includes 4 principal components (N=20 and R2=87.1%)

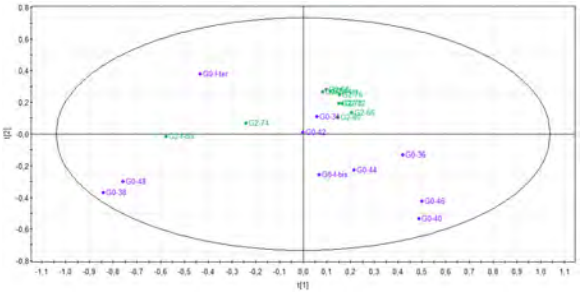


Figure 3: Schematic interpretation of the metabolic modifications observed in exposed dams compared to the control group. The increased or decreased metabolites are shown, respectively, in red or green.

Figure 3a: Metabolic modifications in biological fluids (urine at GD15, plasma at GD21). Underlined: changes in urinary excretion, if not, changes in plasmatic concentrations

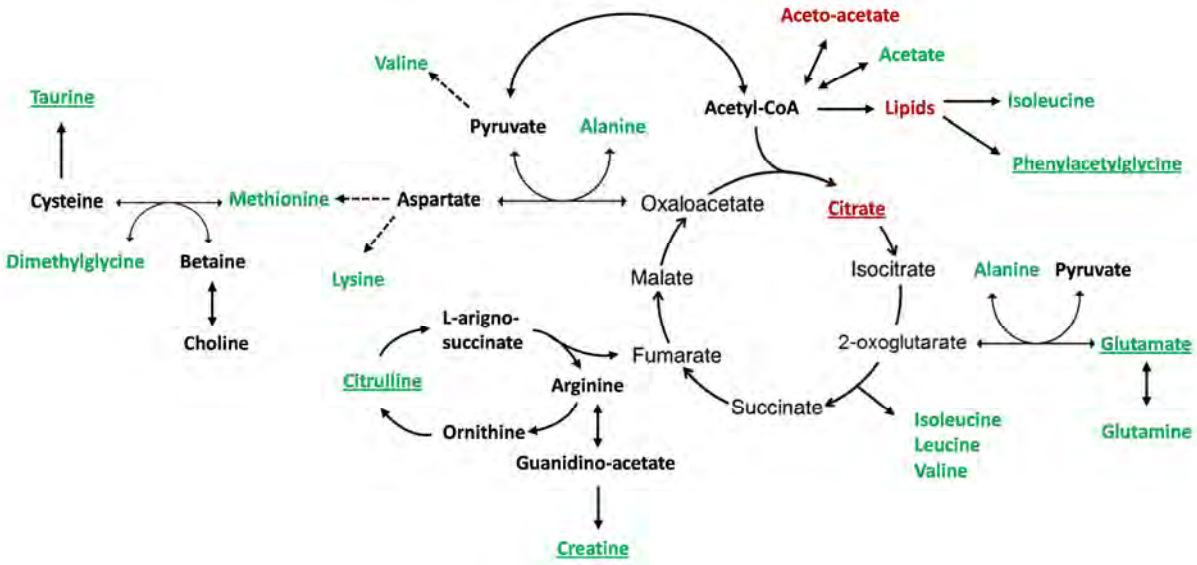


Figure 3b: Metabolic modifications in aqueous tissue extracts (liver and brain). Underlined: changes in liver, if not: changes in brain, boxed text: changes in both tissues

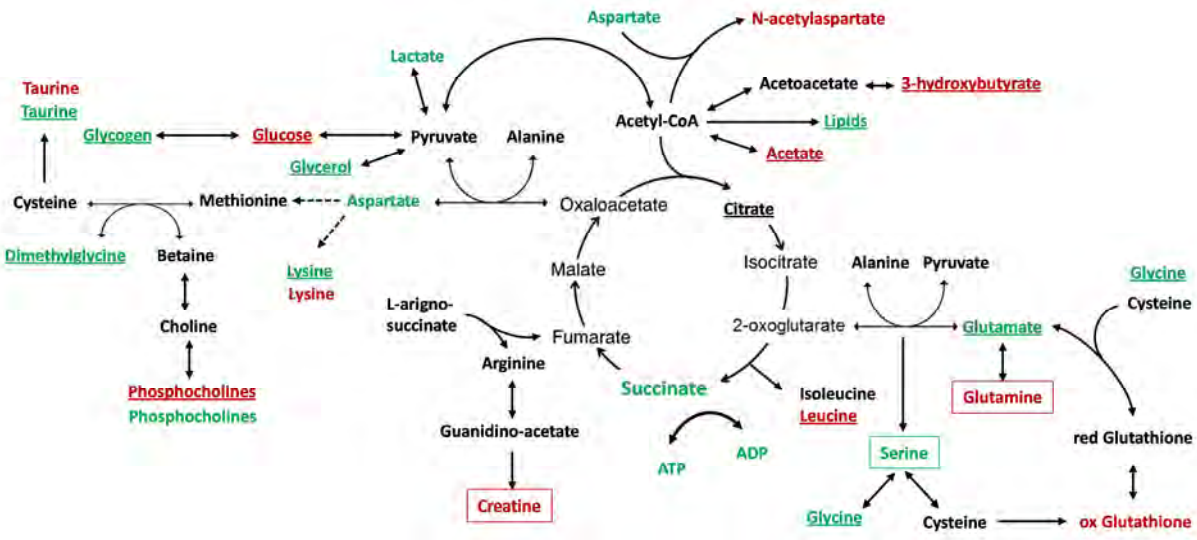
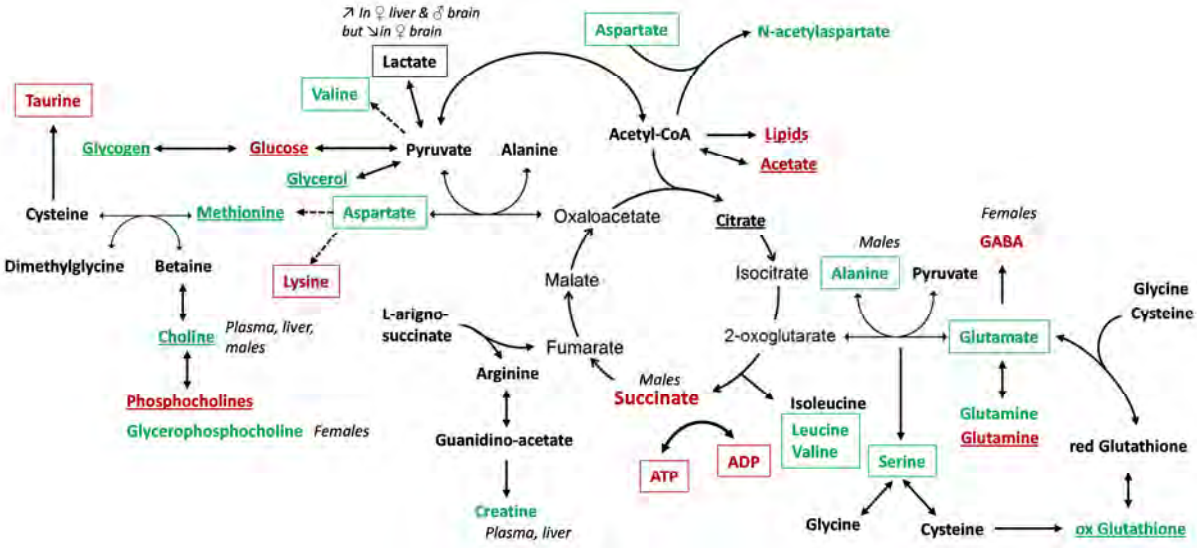


Figure 4: Schematic interpretation of the metabolic modifications observed in exposed fetuses compared to the control group. The increased or decreased metabolites are shown, respectively, in red or green. Dotted underlined: changes in plasma concentrations, underlined: changes in liver, if not: changes in brain, boxed text: changes in both tissues, italics: gender specificity.



CHAPITRE 5 : DISCUSSION GENERALE

1. Approche en population humaine, apport de l'épidémiologie

Les outils chimiométriques utilisés (RMN, PLS-DA) ont permis de discriminer des individus *a priori* exposés de manière contrastée aux pesticides, même si tous les paramètres physiologiques et humains influençant le profil métabolique n'ont pu être maîtrisés. C'est souvent le cas de l'alimentation (principalement la nature des aliments qui sont ingérés en amont du recueil biologique) ou de la médication par exemple. La sélection de populations ayant des caractéristiques physiologiques, culturelles ou nutritionnelles (âge, sexe, pays, lieu de résidence, ethnicité…) peu éloignées permet de mettre en évidence des modifications métaboliques avec des effectifs raisonnables. C'est le cas des femmes incluses dans la cohorte PELAGIE qui constituent une population assez homogène d'un point de vue physiologique et culturel (même sexe, âge de 25 à 35 ans pour la plupart, peu de médication, de tabagisme ou de consommation d'alcool en lien avec le niveau socio-économique assez élevé de la cohorte et le fait d'être enceinte, et enfin culture similaire (une seule région d'un seul pays représentée)), et pour laquelle il a été possible de créer des groupes d'exposition différents.

Au final, nous avons observé une association significative entre les modifications de l'excrétion urinaire de plusieurs métabolites chez les femmes enceintes résidant dans des communes où une large part de surface était dédiée à la culture de céréales (plus de 17 ou plus de 25 %) par rapport aux femmes résidant dans des communes moins concernées par ces cultures – et donc potentiellement les plus exposées aux pesticides. Nous avons associé aux approches chimiométriques classiques (spectroscopie et analyses multivariées) une prise en compte des facteurs de confusion susceptibles d'avoir une influence sur le métabolome (âge, tabagisme, IMC, etc.). Cette régression effectuée sur les données brutes (valeur d'intégration réelle correspondant à chaque bucket sélectionné avant le filtrage OSC) permet de conforter les résultats significatifs mis en évidence avec l'analyse PLS-DA. Les groupes d'individus ont été discriminés sur la base d'une augmentation des concentrations urinaires de glycine, glycérophosphocholine, lactate et thréonine et d'une diminution de l'excrétion du citrate. Ces observations nous ont permis de poser des premières hypothèses exploratoires sur la possibilité d'un mécanisme protecteur permettant aux cellules de

s'adapter face à un stress oxydant (augmentation des osmo-protecteurs, modification du cycle de Krebs).

Le fait de recueillir parallèlement de nombreuses informations sur les caractéristiques et habitudes de vie des individus permet d'en tenir compte comme variable d'ajustement dans les modélisations. Cela est d'autant plus important au regard des connaissances acquises sur les profils métaboliques en lien avec des caractéristiques physiologiques ou liées au mode de vie. Par exemple, l'excrétion d'acide hippurique urinaire est diminuée chez les personnes obèses ou en surpoids (IMC supérieur à 25) par rapport aux individus de poids normal. De même, le fait de fumer est un facteur important dans l'augmentation du stress oxydant et donc potentiellement dans la modification de l'excrétion des molécules osmoprotectrices, du glutathion ou de la taurine. Ne pas avoir pris en compte ces facteurs (IMC, tabagisme) ne nous aurait pas permis de mettre en lien les modifications observées (cycle de Krebs et molécules osmo-protectrices) avec les expositions aux pesticides. Il n'est cependant pas exclu que d'autres facteurs influençant le métabolome et liés aux groupes d'exposition n'aient pas été pris en compte, et puissent expliquer en partie les discriminations observées.

La discrimination a également été possible chez les enfants à la naissance au travers de l'analyse du sang de cordon. Ce sont principalement des modifications dans le métabolisme des acides aminés qui ont été observées (leucine, isoleucine, valine, sérine, glutamate, lysine, méthylhistidine, aspartate, tyrosine). Dans la modélisation PLS, nous avons systématiquement réalisé un filtrage OSC qui correspond à réduire la partie des X (variables buckets) non corrélée aux groupes d'exposition. La PLS a donc été réalisée sur les résidus E (E=X-D ou D équivaut aux régressions sur les composantes orthogonales aux groupes d'exposition). Le choix du nombre de composantes orthogonales à soustraire est réalisé sur la base de critères statistiques (valeur propre moyenne de l'ACP). Nous avons observé que l'analyse des profils métaboliques des urines avait nécessité la soustraction de plus de composantes orthogonales lors du filtrage OSC que pour l'analyse des profils métaboliques des sangs de cordon, ce qui globalement confirme la plus grande variabilité des profils urinaires comparés aux profils sanguins mise en évidence dans la littérature (plus faible influence du repas ou du moment du recueil biologique au cours de la journée par exemple) (Kim *et al.* 2014). Si le recueil est plus simple et non invasif, les urines sont donc à considérer

comme plus complexes à analyser, comparées au sang. Cela peut également être lié au fait que l'empreinte urinaire a été réalisée sur un recueil unique et non sur un recueil de 24h, où la variabilité intra-individuelle s'estompe en partie.

Enfin, l'exclusion des individus présentant une issue de grossesse défavorable (prématurité, retard de croissance intra-utérin, malformations congénitales) peut être considérée comme un avantage dans cette démarche. La mise en évidence de modifications métaboliques chez les femmes et les enfants de notre échantillon permet de suggérer un effet subtil n'étant pas la conséquence d'une pathologie préexistante. La comparaison des empreintes métaboliques du sang de cordon à la naissance d'enfants de poids normal ou de très petit poids de naissance (SGA, RCIU) a révélé une augmentation de la bêta-oxydation signant une altération du métabolisme énergétique et une diminution du glutamate et de la glutamine chez les enfants prématurés (Alexandre-Gouabaud *et al.* 2013), ainsi qu'une modification du métabolisme des acides aminés (phénylalanine, tryptophane, glutamine, alanine, proline, phénylalanine) (Fanos *et al.* 2013). Ont également été observées chez les prématurés, une modification des concentrations sanguines d'arginine, leucine, et valine et de certaines hormones (Wilson *et al.* 2014), et une augmentation des polyamines acétylées (Alexandre-Gouabaud *et al.* 2013). Des caractéristiques métaboliques particulières ont également été observées dans les urines de femmes enceintes au second trimestre de grossesse et ayant donné naissance à un enfant présentant une malformation ou une anomalie chromosomique (bêta-oxydation, augmentation de l'activité du cycle de Krebs, modification de l'excrétion des acides aminés) (Diaz *et al.* 2013). On ne peut donc pas exclure que les mécanismes biologiques suggérés dans notre étude (stress oxydant, modifications du métabolisme des acides aminés) soient précurseurs d'un futur état de santé altéré.

2. Approche expérimentale et suggestion mécanistiques

Nous avons observé des modifications métaboliques sur l'ensemble des fluides et tissus biologiques du groupe exposé comparé aux témoins. Il est à noter que, comme attendu, la variabilité interindividuelle au cours de l'expérimentation animale a été suffisamment contrôlée (utilisation d'animaux provenant de la même souche, conditions environnementales maîtrisées) pour observer des séparations entre les groupes à partir des

techniques d'ACP (analyse sans *a priori*) pour les profils métaboliques plasmatiques (mères et fœtus), du foie (extraits aqueux des mères et des fœtus, extraits lipidiques des mères) et du cerveau (extraits aqueux des mères).

Les pesticides auxquels ont été exposés les animaux ont été retenus pour se rapprocher au mieux de l'exposition environnementale locale attendue des femmes de la cohorte PELAGIE. Il s'agit de 3 herbicides (acétochlore, bromoxynil et glyphosate), 2 régulateurs de croissance (éthéphon et chlorméquat), 1 fongicide (fenpropimorphe) et 2 insecticides (carbofuran et imidaclopride) qui ont été largement utilisés entre 2000 et 2005 sur les grandes cultures bretonnes. Les doses utilisées dans cette expérimentation animale peuvent être considérées comme faibles puisqu'au total, l'exposition représente moins de 500 μg/kg poids corporel/j, équivalent à la somme de chacune des DJA des pesticides retenus. On peut toutefois noter que pour l'acétochlore et le carbofuran, l'exposition des animaux est proche des indicateurs toxicologiques les plus faibles mis en évidence dans la littérature (pour l'acétochlore, un LOAEL d'environ 1 mg/kg/j correspondant à une augmentation du poids des reins et une basophilie tubulaire a été défini chez la souris mâle exposée pendant 78 semaines ; pour le carbofuran, l'exposition unique par gavage de rats nouveau-nés femelles correspondant à une diminution de 10 % d'acétylcholinestérase 30 minutes après a été estimée à 30 μg/kg/j). L'exposition à faibles doses à 8 molécules différentes est une originalité dans ce projet au regard de l'analyse de la littérature qui montre encore la rareté des études toxicologiques conduites dans des conditions proches de l'exposition humaine (aussi bien en termes de complexité que de niveau de doses) (voir chapitre 1).

Au final, les discriminations les plus marquantes au regard de l'exposition concernent des modifications dans le métabolisme énergétique, le métabolisme des acides aminés, du glucose et des lipides. De nombreux métabolites peuvent être associés au fonctionnement du cycle de Krebs, comme le citrate, le succinate, le lactate, le glutamate, l'aspartate ou encore la glutamine. Ces modifications peuvent être mises en lien avec une altération de la néoglucogenèse (modification d'alanine, glucose, glycogène, glycérol) sans que l'on puisse directement établir si cette dernière est une cause ou une conséquence de la modification observée au niveau du cycle de Krebs. Un certain nombre de molécules impliquées dans les mécanismes cellulaires osmo-protecteurs sont également modifiées (choline, phosphocholines, taurine, diméthylglycine, glutathion) suggérant une adaptation face à un

éventuel stress oxydant. Ces éléments permettent de suggérer un mécanisme cellulaire tel que représenté schématiquement sur la figure 13, où stress oxydant et dysfonctionnement mitochondrial engendreraient des modifications dans la signalisation cellulaire et conduiraient à des phénomènes inflammatoires pouvant expliquer l'altération de l'homéostasie du glucose et l'augmentation des lipides plasmatiques. De manière plus directe, le stress oxydant pourrait également expliquer la modification du ratio des acides gras saturés *versus* insaturés observée au niveau hépatique chez les mères. En effet, les acides gras insaturés sont plus sensibles à la péroxydation et sont donc la première cible du stress oxydant. En revanche, il n'est pas possible de savoir si le stress oxydant est la conséquence du dysfonctionnement mitochondrial ou plus directement de l'exposition aux pesticides.

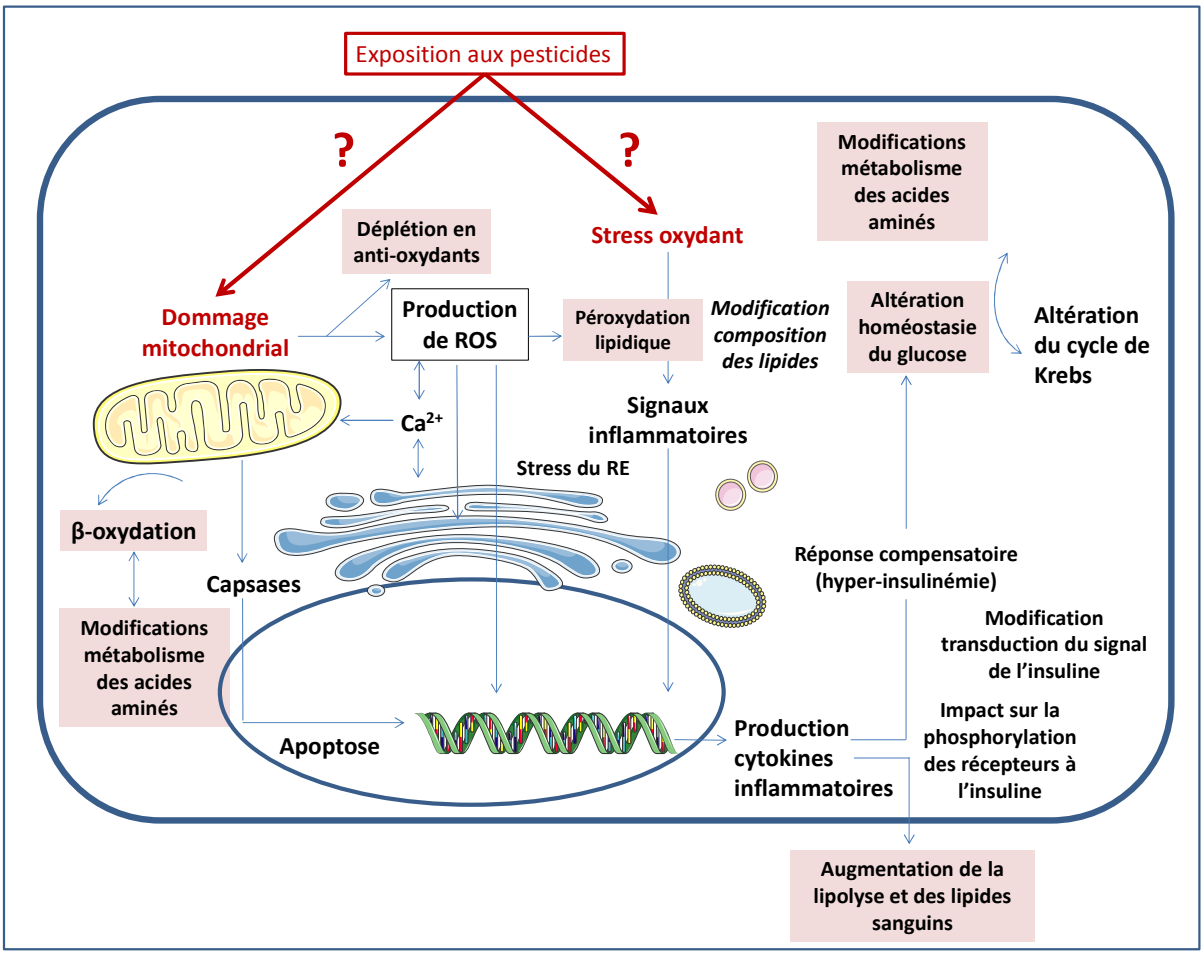


Figure 3 : Suggestion des mécanismes biologiques induits chez des rates gestantes après exposition orale du 4ème au 21ème jour à 8 pesticides utilisés en Bretagne en 2004 (acétochlore, bromoxynil, carbofuran, chlormequat, étéphon, fenpropimorphe, glyphosate, imidaclopride)

Le dysfonctionnement mitochondrial est un mécanisme d'action largement évoqué dans la littérature pour des insecticides comme la roténone (Greenamyre *et al.* 2003) ou le paraquat (Cochemé and Murphy, 2009) pour lesquels des modèles expérimentaux de pathologies neurodégénératives ont même été proposés (Tanner *et al.* 2011). Ces pesticides sont tous deux des inhibiteurs du complexe mitochondrial I de la chaîne respiratoire. Le blocage de la respiration cellulaire est également l'un des modes d'action des fongicides strobilurines au niveau des micro-organismes (action sur le complexe mitochondrial III) (Hollingworth, 2001). Compte tenu de l'implication de la mitochondrie dans la génération de ROS, de nombreux travaux ont été conduits ces dernières années pour mieux comprendre l'impact des pesticides au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ces travaux sont l'objet de 2 revues récentes qui permettent de conclure que de nombreux pesticides, de familles chimiques et structures différentes, peuvent induire des altérations du fonctionnement de la mitochondrie, même si ce mécanisme n'est pas le principal identifié dans le développement des molécules actives (Baltazar *et al.* 2014 ; Karami-Mohajeri and Abdollahi, 2013). Dans le tableau 7 sont présentés les mécanismes d'action des différents pesticides en lien avec la mitochondrie.

Tableau 4 : mécanismes d'action des pesticides au niveau de la mitochondrie

Pesticides	Famille chimique	Mécanisme mitochondrial
Azoxystrobine, krésoxim-méthyle	Strobilurines	Inhibition du complexe III (principal mode d'action)
Roténone	Ichtyotoxine	Inhibition du complexe I, génération de ROS
Paraquat	Dipyridylium	Inhibition des complexes I et III, génération de ROS
Cyperméthrine	Pyréthrinoïde	Génération de ROS, péroxydation lipidique
Maneb	Dithiocarbamate	Inhibition du complexe III
Dieldrine	Organochloré	Inhibition du complexe III, modulation des capsases mais pas de génération de ROS
Endosulfan	Organochloré	↗ activité MnSOD et GPx (impact sur système antioxydant)
Parathion	Organophosphoré	Inhibition du complexe II, IV et de l'ATP synthase
Malathion	Organophosphoré	↗ activité MnSOD et GPx, péroxydation lipidique
Dichlorvos	Organophosphoré	Altération des complexes I, II, III, IV, génération de ROS, oxydation ADN, ↘ activité MnSOD, inflammation
Monochrotophos	Organophosphoré	Altération des complexes I, II, (± IV) et V (ATP synthase)
Chlorpyrifos	Organophosphoré	Impact sur les complexes I et IV, ↘ production d'ATP
Mevinphos	Organophosphoré	Altération des complexes I, III, IV
Metaphos, triortho-crésylphosphate	Organophosphoré	Altération du complexe II
Bromoxynil	Hydroxybenzonitrile	Découplant, modification du fonctionnement de l'ATP synthase

MnSOD : manganèse superoxyde dismutase, GPx : glutathion peroxydase (enzymes de séquestration des ROS produisant respectivement H_2O_2 et H_2O).

La représentation schématique des effets de ces pesticides au niveau de la mitochondrie permet de les mettre en lien afin d'aboutir à une cascade d'évènement conduisant à une modification de la signalisation cellulaire et entraînant des phénomènes d'apoptose (Figure 14) : l'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale et l'effet sur le cycle de Krebs conduisent à une déplétion en ATP cellulaire. L'induction d'un stress oxydant peut avoir un impact sur la signalisation cellulaire apoptotique elle-même en lien avec les modifications de perméabilité membranaire (qui modifient les flux de calcium intracellulaire).

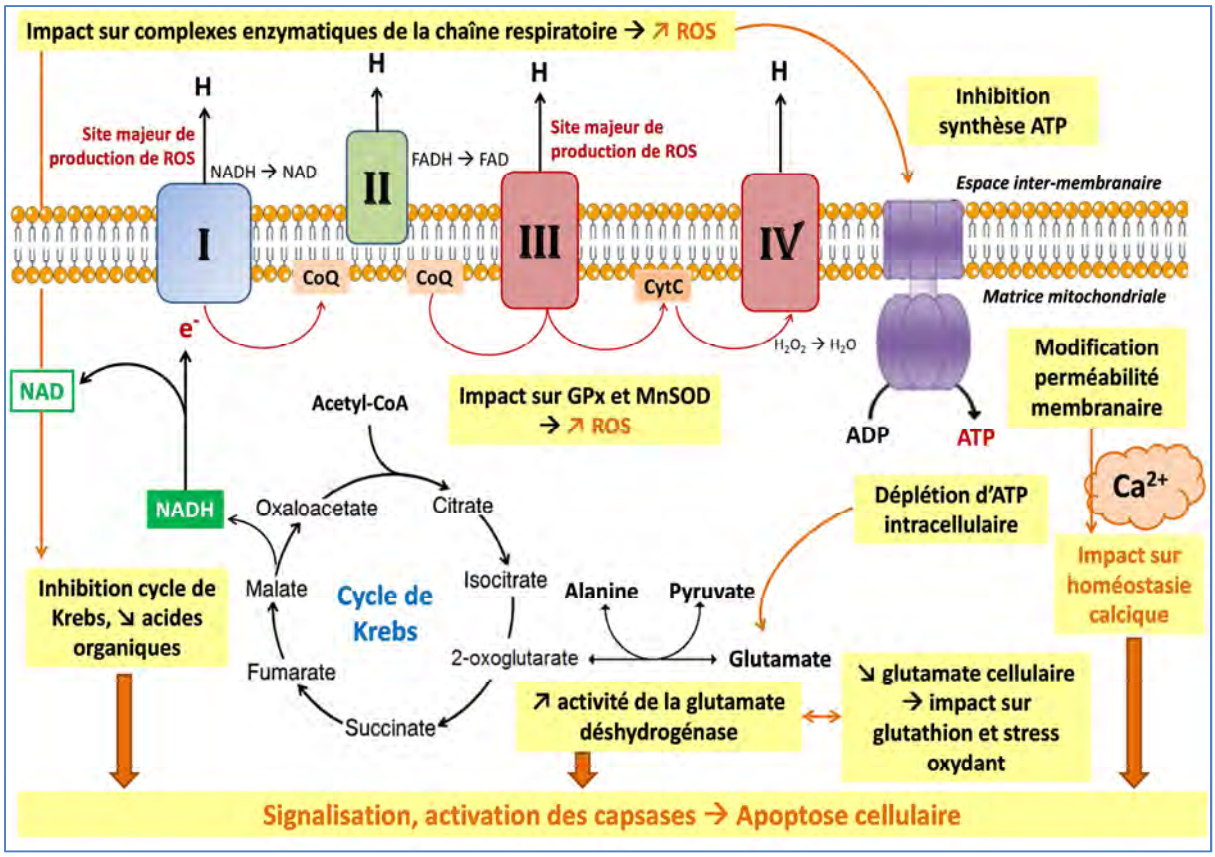


Figure 4 : Représentation schématique des effets des pesticides sur la mitochondrie (adapté de Karami-Mohajeri and Abdollahi, 2013). ROS : reactive oxygen species ; NADH : nicotinamide adénine dinucléotide ; FADH : flavine adénine dinucléotide ; GPX : glutathion péroxydase ; MnSOD : Manganèse superoxyde dismutase ; ATP : adénosyl triphosphate ; ADP : adénosyl diphosphate ; CoQ : coenzyme Q ; CytC : cytochrome C.

Les hypothèses de génération de ROS émises à l'issue de ce travail sont donc tout à fait plausible au regard de ces éléments, en particulier chez les femelles gestantes. Néanmoins, l'augmentation d'ATP et de GABA mise en évidence dans le cerveau des fœtus laisse suggérer un mécanisme complémentaire différent. A ce stade, il n'est pas possible de savoir

si ce mécanisme est lié à l'action directe des pesticides auxquels les fœtus sont exposés, ou à un phénomène d'adaptation à l'environnement métabolique modifié de la mère. Cela nécessiterait la réalisation d'études complémentaires.

En outre, il est intéressant, voire surprenant, de noter que quels que soit les pesticides étudiés (différentes familles, différentes structures, seuls ou en mélange), et quel que soit leur mode d'action sur les indésirables (très différents d'une molécule à l'autre si l'on se réfère au tableau 1), l'exposition aux pesticides semble conduire à une empreinte métabolique relativement commune impliquant toujours des métabolites ayant un rôle dans le stress oxydant et plus généralement le métabolisme énergétique (tableau 8). Cette signature conduit à la modification de créatine, de choline et dérivés, de certains osmolytes, de lactate et autres acides organiques à courte chaîne, et d'alanine (Keum *et al.* 2010).
D'autres études mécanistiques mériteraient d'être mises en œuvre pour mieux comprendre le rôle de chacun des pesticides dans les modifications métaboliques observées et la possibilité d'identifier une signature particulière.

Tableau 5 : Principales suggestions mécanistiques faites à l'issue des études toxicologiques de métabolomique en lien avec l'exposition aux pesticides

Pesticides	Protocoles	Principaux résultats	Références
Endosulfan (OC)	Souris – voie orale - périodes pré/ post-natale	Stress oxydant hépatique	Canlet et al. 2013
Propoxur (CARB)	Rats ♂ - voie orale - 28 j	Stress oxydant, altération du métabolisme énergétique et lipidique (cétogénèse et β-oxydation)	Liang et al. 2012a,b
Dichlorvos (OP)	Rats ♂ - voie orale - 24 sem	Stress oxydant, altération du métabolisme des sucres et des acides gras	Yang et al. 2011, 2013
Diméthoate (OP)	Rats ♂ - voie orale - 24 sem	Stress oxydant, altération du métabolisme des acides gras, des acides aminés, et du cycle du citrate	Feng et al. 2012
Acéphate (OP)	Rats ♂ - voie orale - 24 sem	Altération du métabolisme du glucose, des acides nucléiques et des protéines	Hao et al. 2012
Phorate (OP)	Rats ♂ - voie orale - 24 sem	Stress oxydant, altération du métabolisme énergétique et des acides nucléiques	X. Sun et al. 2014
Chlorpyrifos + carbaryl (OP/ CARB)	Rats – voie orale – 90 j	Altération du métabolisme énergétique et des acides gras dans le foie	Wang et al. 2009, 2011
Dichlorvos + deltaméthrine (OP/ PYY)	Rats – voie orale – 90 j	Altération du métabolisme énergétique hépatique	Wang et al. 2013
Propoxur + perméthrine (CARB/ PYR)	Rats – voie orale – 90 j	Altération du métabolisme énergétique (cycle du citrate, métabolisme du glucose, ↗ β-oxydation)	Liang et al. 2012c
Perméthrine + deltaméthrine (PYR)	Rats ♂– voie orale – 60 j	Altération du métabolisme énergétique (↗ glycolyse anaérobie, β-oxydation et cétogénèse)	Liang et al. 2013
Dichlorvos + diméthoate + acéphate + phorate (OP)	Rats ♂ - voie orale - 24 sem	Stress oxydant, dommage à l'ADN, altération du métabolisme des lipides et du métabolisme énergétique	Du et al. 2013
Endosulfan + atrazine + chlorpyrifos (OC/ OP/ triazine)	Souris – voie orale - périodes pré/ post-natale	Altérations du métabolisme des acides aminés et du glucose, des cycles du citrate et de l'urée	Demur et al. 2013
Mélange de 6 pesticides (OC/ OP/ dithiocarbamates)	Souris – voie orale – 4 sem	Stress oxydant et altération du métabolisme du glucose au niveau hépatique	Mehri et al. 2010

OC: organochlorés; OP : organophosphorés; CARB : carbamates ; PYR : pyréthrinoïdes

3. Association des démarches épidémiologique et toxicologique

L'approche épidémiologique a permis de montrer une discrimination sur les profils métaboliques d'individus exposés aux pesticides de manière contrastée, à la fois dans l'urine des femmes au premier trimestre de la grossesse, et dans le sang de cordon à la naissance (pour les garçons, seule population analysée à ce jour). Une hypothèse de stress oxydant a été suggérée au regard des données urinaires. Il est pour l'instant difficile de mettre en lien cette hypothèse avec les modifications observées dans le sang des enfants à la naissance (modifications concernant principalement les acides aminés) mais on ne peut pas non plus l'exclure. Les données produites ne permettent pas non plus de suggérer des mécanismes spécifiques en lien avec d'éventuels effets sanitaires, qu'ils soient identifiés à court ou à long terme.

Les données animales générées permettent de confirmer l'hypothèse de stress oxydant – à la fois chez la mère et chez les fœtus – induit par l'exposition orale à 8 pesticides à faibles doses. En outre, la diminution des concentrations en acides aminés plasmatiques chez les femelles gestantes n'est pas en faveur de l'hypothèse de perturbation des transferts placentaires émise à l'issue de l'étude chez l'Homme. La diminution des concentrations plasmatiques ou sériques en acides aminés observée respectivement chez les rats fœtus ou chez les nouveau-nés de la cohorte PELAGIE sont donc soit la conséquence de la diminution des concentrations d'acides aminés dans le sang maternel (observé chez l'animal, pas de recueil sanguin de la mère chez l'Homme), soit une conséquence directe du stress oxydant sur l'organisme en développement.

L'une des principales limites de l'expérimentation animale concerne la voie d'exposition utilisée (voie orale *via* l'alimentation) qui ne reflète qu'en partie les voies d'exposition locale aux pesticides des femmes de la cohorte PELAGIE (potentiellement voies respiratoire et orale) et qui pourrait avoir un impact sur les observations faites. De plus, la dose totale choisie a été arbitrairement fixée à la somme de chacune des DJA des pesticides. S'il s'agit d'une faible dose, elle ne peut être considérée comme équivalente à l'exposition humaine.

La persistance des modifications métaboliques n'a pu être étudiée (absence de recueil biologique répété) et il est possible que certaines modifications soient réversibles et n'aient que peu de conséquences sur un organisme adulte (exemple des modifications observées 8 ou 24 h après l'exposition à la carbendazime ou au chlorméquat, disparaissant ensuite (Jones *et al.* 2013)). Mais compte tenu des bouleversements hormonaux et des modifications dans les processus cellulaires à la fois de la femme enceinte et du fœtus, ceux-ci sont rendus particulièrement vulnérables. Ainsi, si ces observations sont difficiles, à elles seules, à mettre en lien avec d'éventuels effets néfastes, les modifications métaboliques pouvant être le reflet d'une simple adaptation de l'organisme à un stimulus extérieur, les hypothèses posées sur le stress oxydant peuvent nous conduire à suggérer une altération des processus cellulaires qui pourrait avoir un impact à plus long terme sur la santé de l'enfant. En effet, il n'est pas exclu que des phénomènes d'adaptation chez la femme enceinte conduisent à des modifications dans les processus cellulaires chez les enfants, qui pourraient ensuite perturber le développement normal de l'organisme et conduire à des modifications durables (exemple des modifications de l'homéostasie du glucose qui, par des phénomènes d'adaptation, peuvent conduire à une insulino-résistance chez l'enfant). Les travaux de recherche doivent donc se poursuivre pour tenter de répondre à cette question.

CHAPITRE 6 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES

1. Conclusion

Les expositions environnementales aux pesticides pendant la grossesse et leurs éventuelles conséquences sanitaires sont un sujet de préoccupation en santé publique. Si elles ne permettent pas de conclure avec certitude, les nombreuses études épidémiologiques menées depuis le début du XXI^{ème} siècle suggèrent des associations avec certaines issues de grossesse défavorables liées à la croissance de l'enfant, ou encore avec son développement neurologique. La plupart des études s'intéressent spécifiquement aux insecticides organochlorés, organophosphorés ou aux herbicides triazines. Peu de connaissances ont été produites sur les autres pesticides, aussi bien en termes d'exposition que de risque.

Comme l'a montré ce travail, la métabolomique est un outil qui dispose d'un potentiel particulièrement intéressant pour ces études en raison :

- de la possibilité d'identifier des métabolites sans *a priori* dans les fluides biologiques humains, et donc de s'intéresser directement aux expositions humaines complexes à faibles doses ;
- de la possibilité d'observer des modifications de voies métaboliques susceptibles d'avancer des hypothèses mécanistiques pour une meilleure compréhension des effets des substances.

C'est donc un outil qui mérite d'être développé en santé environnementale. Plusieurs perspectives de recherche ont été identifiées.

2. Perspectives de recherche

2.1. Perspectives à court terme

2.1.1. Etude des facteurs de variation du métabolisme humain

Le métabolisme d'un individu est largement influencé par ses caractéristiques physiologiques et génétiques, son environnement (en lien avec l'épigénome) et son style de vie. L'étude de l'influence de ces caractéristiques fait l'objet de travaux publiés dans la littérature ces dernières années. Il serait intéressant de poursuivre l'amélioration des connaissances dans ce domaine, en particulier à partir de la population de femmes enceintes PELAGIE.

L'exploitation des données sur le filtrage OSC effectué lors de l'analyse des urines des femmes pourrait orienter sur des facteurs de variation à étudier par la suite. Les premières données exploitées dans ce travail ont montré l'influence de la semaine de gestation sur l'excrétion des métabolites urinaires. L'identification des métabolites impliqués dans les séparations observées après modélisation PLS-DA pourrait permettre d'améliorer les connaissances sur le métabolisme de la grossesse et les éventuels facteurs de confusion complémentaires à prendre en compte dans les études épidémiologiques (on connaît par exemple à ce jour les variations de créatinine urinaire en fin de grossesse). Ces résultats seront approfondis par une analyse spécifique de ce facteur de variation.

2.1.2. Confirmation des hypothèses de stress oxydant chez l'Homme

Il serait intéressant de pouvoir confirmer l'hypothèse de stress oxydant suggérée au regard des modifications métaboliques observées chez les femmes enceintes et de voir si les modifications observées chez les enfants à la naissance peuvent être la conséquence de ce stress oxydant. Sur la base des travaux décrits par Ellis *et al.* (2012), qui ont observé un lien entre l'exposition environnementale au cadmium et la modification de métabolites impliqués dans les voies mitochondriales et des acides aminés, associé à l'oxydation de l'ADN, nous pourrions poursuivre l'étude humaine par la mesure de la 8-oxodésoxyguanosine urinaire chez les femmes enceintes, qui est un marqueur du stress

oxydant, produit par l'oxydation de l'ADN. Cette quantification pourrait également être réalisée dans le sang de cordon à la naissance.

2.1.3. Empreintes métaboliques et cocktails de pesticides

Cette étude a mis en évidence des modifications métaboliques impliquées dans le stress oxydant chez les femmes résidant dans des communes où les cultures de céréales représentaient une part importante de la surface agricole utile de la commune. Une surexposition à l'azoxystrobine et au fenpropimorphe a également été mise en évidence sur un petit nombre de femmes (n=40) résidant dans ces communes. Compte tenu des éléments disponibles dans la littérature sur les mécanismes d'action toxique des pesticides, et au regard des nombreuses études de métabolomique qui ont mis en évidence un impact sur le métabolisme énergétique, le métabolisme du glucose et celui des lipides, il serait intéressant de comprendre si une empreinte métabolique commune pourrait être considérée comme la signature de l'exposition à différents mélanges complexes de pesticides. Ainsi, sur la base des travaux de Chevrier *et al.* (2014), qui ont montré une surexposition à l'acétochlore ou à l'atrazine en fonction de la ruralité ou de la proximité des champs de maïs, l'étude des modifications métaboliques à partir de groupes d'exposition reflétant d'autres types de cultures et par conséquent d'autres mélanges de pesticides pourrait être menée dans un futur proche.

2.1.4. Amélioration des connaissances mécanistiques

En toxicologie, l'une des perspectives immédiates de ce travail est d'approfondir l'exploitation de l'étude expérimentale réalisée, par la meilleure connaissance de l'impact de l'exposition aux pesticides sur le contenu lipidique des foies et des cerveaux des mères et des fœtus. Ces travaux sont motivés par les premiers résultats que nous avons observé sur les modifications significatives de la masse de lipides contenue dans le foie des mères, et des ratios d'acides gras (saturés / insaturés ; mono-insaturés / di-insaturés) respectivement dans le foie et le cerveau des mères. Des analyses de lipidomique pourraient nous permettre d'avoir une connaissance plus fine des modifications observées au niveau des lipides afin de mieux comprendre l'impact de ces modifications sur l'organisme.

Parallèlement, la disponibilité des empreintes métaboliques par spectrométrie de masse pour les 338 échantillons urinaires des femmes PELAGIE (réalisées dans le cadre des travaux associés, par UHPLC-HRMS) permettrait d'identifier des métabolites complémentaires, dont ceux à l'état de traces qui ne sont pas détectés par spectrométrie RMN. De plus, les profils métaboliques obtenus pourraient être utilisés dans la modélisation des réseaux métaboliques. Une analyse des métabolites à l'échelle du système biologique permettrait d'identifier des voies métaboliques potentiellement atteintes et les éventuelles interactions entre ces voies, de confirmer (ou pas) les hypothèses émises à l'issue de ce travail, et de mettre en lien ces éléments au regard des connaissances acquises à l'issue de l'expérimentation animale. Des outils internet du type « *KeggPathway* » ou « *MetExplore* »[4] pourraient être utilisés.

2.2. Perspectives à long terme

2.2.1. Amélioration des connaissances sur la variabilité du métabolome humain

La mesure répétée dans le temps au cours de la grossesse sur un même individu (par exemple chaque semaine, ou en lien avec des étapes clés du développement embryonnaire et fœtal) permettrait d'améliorer les connaissances sur la variabilité intra-individuelle du métabolome. Une meilleure connaissance des spécificités métaboliques des femmes enceintes par rapport à la population générale serait également nécessaire surtout si l'on envisage de développer la métabolomique dans les programmes de biosurveillance ou les cohortes épidémiologiques.

2.2.2. Prédictivité de la métabolomique en santé environnementale

Il serait intéressant d'étudier le lien entre les modifications métaboliques observées chez la mère ou chez l'enfant à la naissance et les paramètres de santé recueillis dans la cohorte PELAGIE (périmètre crânien, poids de naissance, comportement, croissance, obésité), afin de

[4] KeggPathway pour Kyoto Encyclopedia gene and genome est une base de données développée par l'Université de Kyoto, qui propose une cartographie complète représentant les connaissances relatives aux interactions moléculaires et aux réactions enzymatiques du métabolisme, et présenté par voie métabolique (Ogata *et al*. 1998). http://www.genome.jp/kegg/pathway.html#metabolism; MetExplore est un serveur web développé par l'INRA dans le but d'aider à l'identification et à la visualisation des voies métaboliques (Cottret *et al.* 2010).

conforter les premiers résultats observés (diminution de la concentration en acides aminés dans le sang de cordon, modification du métabolisme énergétique possible, étude animale confirmant un dysfonctionnement mitochondrial, avec possibilité de modification de la signalisation cellulaire (inflammation, homéostasie du glucose), stress oxydant). Pour cela, il serait nécessaire de classer les enfants de la cohorte entière en fonction des groupes d'exposition des femmes aux pesticides, tels qu'ils ont été préalablement définis (en fonction de la part de la surface agricole utile de la commune de résidence de la femme occupée par les cultures de céréales), puis d'envisager un suivi, en se focalisant sur le comportement, la croissance, ou l'obésité.

Pour confirmer l'hypothèse suggérée d'un lien entre les modifications métaboliques observées et un marqueur subtil de santé (non traduit de manière clinique), il serait également pertinent de pouvoir comparer des analyses métabolomiques sur trois types de populations : deux groupes de femmes enceintes ayant eu une grossesse normale, l'un peu exposé aux pesticides et l'autre plus exposé, et un groupe de femmes enceintes ayant eu une issue de grossesse défavorable. Cela permettrait de savoir s'il est possible de mettre en évidence une continuité dans les modifications métaboliques concernées.

2.2.3. Etude des interactions gènes – métabolisme – environnement

L'étude de l'exposome des enfants PELAGIE pourrait être envisagée. Le suivi des enfants à long terme permettrait de recueillir – à différentes étapes clés de la vie – des données relatives :

- Au style de vie (par questionnaires) ;
- A l'exposition aux pesticides (par questionnaires, estimations à l'aide de systèmes d'information géographique, mesures environnementales et/ou dans les matrices biologiques) ;
- Aux facteurs de confusion (autres expositions environnementales, tabagisme, médicaments en lien avec le stress oxydant) (par questionnaires et/ ou mesures) ;
- A la santé (par questionnaire, *via* les réseaux de médecins, et/ou examen clinique).

Ces données, associées à l'étude du métabolisme (empreintes urinaires ou sanguines), des susceptibilités génétiques (polymorphismes), ou encore des phénomènes épigénétiques, pourraient être mises en lien à différents moment de la vie des individus comme le montre la figure 15. Il s'agirait de mettre en place une étude de type « GWAS » (*genome wide*

association study) à la fois basée sur l'identification des empreintes métaboliques et le criblage du génome, comme cela a été proposé récemment (Suhre *et al.* 2011).

Cette association entre le génome, le métabolome et l'exposome permettrait d'identifier des gènes candidats ayant un rôle important dans certaines voies métaboliques, et plus spécifiquement dans celles qui ont été modifiées suite à l'exposition aux pesticides (acides aminés, lipides, glucose, cycle de Krebs).

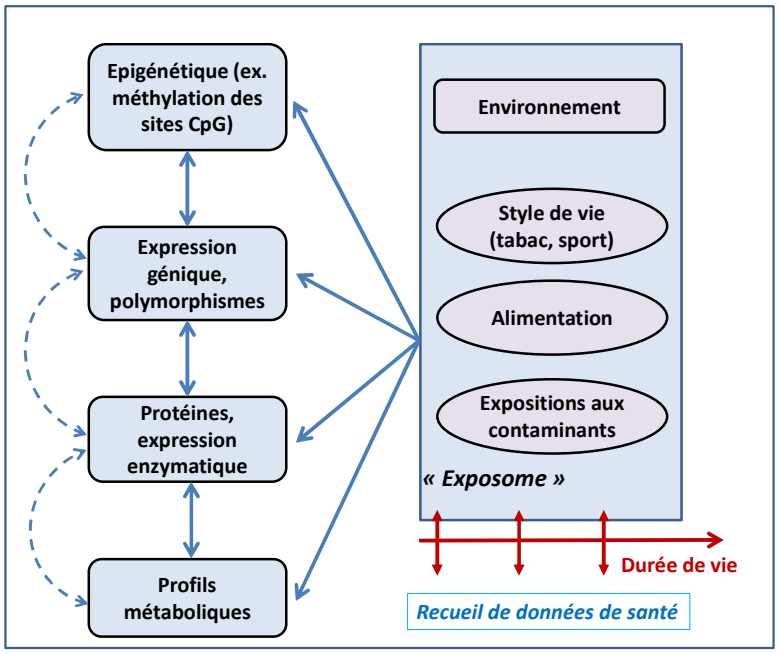


Figure 5 : schématisation des liens entre le génome, l'épigénome, le métabolisme et l'environnement (adapté de Petersen et al. 2014)

Ces éléments pourraient permettre de poser des hypothèses intéressantes sur de nouveaux polymorphismes génétiques en lien avec l'exposition aux pesticides. Des associations pourraient également être étudiées avec la méthylation de l'ADN comme l'ont fait Kettunen *et al.* (2012).

2.2.4. Approfondissement des données toxicologiques

Compte tenu des éléments mis en évidence dans l'étude de métabolomique, il apparaît pertinent de reproduire plusieurs expérimentations animales. La première aurait un protocole d'exposition identique à nos travaux (8 pesticides largement représentés en Bretagne en 2004), mais nécessiterait la constitution de plusieurs groupes d'exposition avec

une dose croissante afin d'exploiter des données de relation dose-réponse. Y seraient ajoutées, en plus des analyses métabolomiques, des analyses clinico-biologiques (mesures des paramètres sanguins) et histo-pathologiques (coupe de foie et de cerveau, microscopie électronique). Les lots de rats pourraient être séparés en deux, afin de poursuivre leur suivi après l'arrêt de l'exposition, en vue de comprendre si les modifications métaboliques ont un caractère réversible ou non (chez les mères, mais également chez les fœtus).

D'autres études expérimentales pourraient ensuite être mises en œuvre pour comprendre le rôle de l'effet cocktail dans les modifications observées (exposition aux pesticides un à un, exposition au mélange).

Les résultats des analyses des pesticides dans les urines des femmes (caractérisation et quantification) permettraient également d'affiner les protocoles d'exposition des animaux, en ne retenant par exemple que les pesticides dont des métabolites ont été caractérisés et/ou quantifiés dans les urines des femmes, et mis en lien avec les groupes d'exposition au céréales préalablement constitués à partir des informations du registre parcellaire agricole.

BIBLIOGRAPHIE

Agopian AJ, Langlois PH, Cai Y, Canfield MA, Lupo PJ. 2013a. Maternal residential atrazine exposure and gastroschisis by maternal age. Matern Child Health J 17: 1768-1775.

Agopian AJ, Lupo PJ, Canfield MA, Langlois PH. 2013b. Case-control study of maternal residential atrazine exposure and male genital malformations. Am J Med Genet A 161A: 977-982.

Agopian AJ, Cai Y, Langlois PH, Canfield MA, Lupo PJ. 2013c. Maternal residential atrazine exposure and risk for choanal atresia and stenosis in offspring. J Pediatr 162: 581-586.

Alexandre-Gouabaud MC, Courant F, Moyon T, Küster A, Le Gall G, Tea I, et al. 2013. Maternal and cord blood LC-HRMS metabolomics reveal alterations in energy and polyamine metabolism, and oxidative stress in very-low birth weight infants. J Proteome Res 12(6): 2764-3778.

Allibe-Signorini N, Berard S, Vincent F, Bessard G, Barret L, Eysseric H. Improvement of toxicologic GC-MS screening using a deconvolution software (AMDIS) and SIM/SCAN mode. 2008. Ann Toxicol Anal. 20(2): 57-65.

ANSES. 2011. Etude de l'alimentation totale française 2 (EAT2). Tome 2: résidus de pesticides, additifs, acrylamide, hydrocarbures aromatiques polycycliques. 405 pages.

ANSES, ORP. 2010. Recommandations et perspectives pour une surveillance nationale de la contamination de l'air par les pesticides. Synthèse et recommandations du comité d'orientation et de prospective scientifique de l'observatoire des résidus de pesticides. Rapport Scientifique. 55 pages.

Aubertot J-N, Barbier J-M, Carpentier A, Gril J-N, Guichard L, Lucas, et al. 2005. Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux. Expertise scientifique collective. Rapport de l'expertise réalisée par l'INRA et le Cemagref à la demande du Ministère de l'agriculture et de la pêche et du Ministère de l'écologie et du développement durable. 68 pages.

Baker SE, Olsson AO, Barr DB. 2004. Isotope dilution high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantifying urinary metabolites of synthetic pyrethroid insecticides. Arch Environ Contam Toxicol 46: 281-288.

Barker DJP, Osmond C, Golding J, Kuh D, Wadsworth MEJ. 1989. Growth in utero, blood-pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. BMJ 298: 564-567.

Barnes S. 2008. Nutritional genomics, polyphenols, diets, and their impact on dietetics. J Am Diet Assoc 108: 1888-1895.

Barouki R, Garlatti M, Tomkiewicz C, Aggerbeck M, Coumoul X. 2006. Nouvelles technologies en toxicologie de l'environnement : Bases fondamentales et applications. Environ Risques Santé 5: 477-488.

Barr DB, Wilder LC, Caudill SP, Gonzalez AJ, Needham LL, Pirkle JL. 2005. Urinary creatinine concentrations in the U.S. population: implications for urinary biologic monitoring measurements. Environ Health Perspect 113: 192-200.

Beckmann M, Enot DP, Overy DP, Draper J. 2007. Representation, comparison, and interpretation of metabolome fingerprint data for total composition analysis and quality trait investigation in potato cultivars. J Agric Food Chem 55: 3444-3451.

Beckonert O, Keun HC, Ebbels TM, Bundy J, Holmes E, Lindon JC, et al. 2007. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. Nature Protocols 2: 2692-2703.

Bell EM, Hertz-Picciotto I, Beaumont JJ. 2001. Case-cohort analysis of agricultural pesticide applications near maternal residence and selected causes of fetal death. Am J Epidemiol 154: 702-710.

Bertram HC, Duus JO, Petersen BO, Hoppe C, Larnkjaer A, Schack-Nielsen L, et al. 2009. Nuclear magnetic resonance-based metabonomics reveals strong sex effect on plasma metabolism in 17-year-old Scandinavians and correlation to retrospective infant plasma parameters. Metabolism 58: 1039-1045.

Bhinder P, Chaudhry A. 2014. Genotoxicity of acephate and profenofos by the PCR-RFLP assay. Toxicol Int 21(1):84-88

Boccolini PM, Boccolini CS, Meyer A, Chrisman JR, Guimaraes RM, Verissimo G. 2013. Pesticide exposure and low birth weight prevalence in Brazil. Int J Hyg Environ Health 216: 290-294.

Bollard ME, Stanley EG, Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E. 2005. NMR-based metabonomic approaches for evaluating physiological influences on biofluid composition. NMR Biomed 18: 143-162.

Bonvallot N, Tremblay-Franco M, Chevrier C, Canlet C, Debrauwer L, Cravedi JP, et al. 2014. Potential input from metabolomics for exploring and understanding the links between environment and health. J Toxicol Environ Health B Crit Rev 17(1): 21-44.

Bothwell JHF, Griffin JL. 2011. An introduction to biological nuclear magnetic resonance spectroscopy. Biol Rev 86: 493-510.

Bouchard MF, Chevrier J, Harley KG, Kogut K, Vedar M, Calderon N, et al. 2011. Prenatal Exposure to Organophosphate Pesticides and IQ in 7-Year-Old Children. Environ Health Perspect 119(8): 1189-1195.

Bradman A, Castorina R, Boyd Barr D, Chevrier J, Harnly ME, Eisen EA, et al. 2011. Determinants of Organophosphorus Pesticide Urinary Metabolite Levels in Young Children Living in an Agricultural Community. Int J Environ Res Public Health 8: 1061-1083.

Breitling R, Pitt AR, Barrett MP. 2006. Precision mapping of the metabolome. Trends Biotechnol 24: 543-548.

Brender JD, Felkner M, Suarez L, Canfield MA, Henry JP. 2010. Maternal pesticide exposure and neural tube defects in Mexican Americans. Ann Epidemiol 20: 16-22.

Burns CJ, McIntosh LJ, Mink PG, Jurek AM, Li AA. 2013. Pesticide exposure and neurodevelopmental outcomes: Review of the epidemiologic and animal studies. J Toxicol Environ Health B Crit Rev 16: 127-283.

Canlet C, Shintu L, Elena-Herrmann B. 2012. La métabolomique par RMN et ses applications en biologie végétale, toxicologie et médecine. L'actualité chimique 364-365: 59-68.

Canlet C, Tremblay-Franco M, Gautier R, Molina J, Métais B, Blas-Y-Estrada F, et al. 2013. Specific Metabolic Fingerprint of a Dietary Exposure to a Very Low Dose of Endosulfan. J Toxicol 545802.

Carmichael SL, Yang W, Roberts EM, Kegley SE, Wolff C, Guo L, et al. 2013. Hypospadias and residential proximity to pesticide applications. Pediatrics 132: e1216-e1226.

Cartier C, Muckle G, Jacobson SW, Jacobson JL, Dewailly E, Ayotte P, Chevrier C, Saint-Amour D. 2014. Prenatal and 5-year p-p'-DDE exposures are associated with altered sensory processing in school-aged children in Nunavik: a visual evoked potential study. Neurotoxicol. In press. doi: 10.1016/j.neuro.2014.04.009.

Casey BJ, Giedd JN, Thomas KM. 2000. Structural and functional brain development and its relation to cognitive development. Biological Psychology 54: 241-257.

Casida J.E. 2010. Chapter 2. Pest toxicology: the primary mechanisms of pesticide action. In: Handbook of pesticide toxicology. Third edition. Robert Krieger. p103-117.

Cellule d'orientation régionale pour la protection des eaux contre les pesticides Région Bretagne. 2007. Présentation des propositions du groupe de travail de la CORPEP en matière de définition locale des engagements unitaires phytosanitaires. Compte-rendu de la réunion du 27 février 2007: enquête sur l'utilisation des produits phytosanitaires sur culture de blé, maïs et colza en 2005. 39 pages. http://draf.bretagne.agriculture.gouv.fr/corpep/.

Center for Disease Control and Prevention. 2013. NHANES. Fourth National Report on Human Exposure to environmental chemicals. Update tables. US Department of Health and Human Service. 770 pages.

Chan EC, Koh PK, Mal M, Cheah PY, Eu KW, Backshall A, et al. 2009. Metabolic profiling of human colorectal cancer using high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance (HR-MAS NMR) spectroscopy and gas chromatography mass spectrometry (GC/MS). J Proteome Res 8: 352-361.

Chen L, Sze SK, Yang H. 2006. Automated intensity descent algorithm for interpretation of complex high-resolution mass spectra. Anal Chem 78: 5006-5018.

Chevrier C, Limon G, Monfort C, Rouget F, Garlantezec R, Petit C, et al. 2011. Urinary biomarkers of prenatal atrazine exposure and adverse birth outcomes in the PELAGIE birth cohort. Environ Health Perspect 119: 1034-1041.

Chevrier C, Petit C, Limon G, Montfort C, Durand G, Cordier S. 2009. Biomarqueurs urniaires d'exposition aux pesticides des femmes enceintes de la cohorte Pélagie réalisée en Bretagne, France (2002-2006) . Bulletin hebdomadaire Epidémiologique Hors Série: 23-27.

Chevrier C, Warembourg C, Gaudreau E, Monfort C, Le Blanc A, Guldner L, Cordier S. 2013. Organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls, seafood consumption, and time-to-pregnancy. Epidemiology 24(2): 251-260.

Chevrier C, Serrano T, Lecerf R, Limon G, Petit C, Monfort C, Hubert-Moy L, Durand G, Cordier S. 2014. Environmental determinants of the urinary concentrations of herbicides during pregnancy: the PELAGIE mother-child cohort (France). Environ Int. 2014;63: 11-18.

Clarke CJ, Haselden JN. 2008. Metabolic profiling as a tool for understanding mechanisms of toxicity. Toxicologic Pathology 36: 140-147.

Cochemé HM, Murphy MP. 2009. Chapter 22 : The uptake and interactions of the redox cycler paraquat with mitochondria. Methods Enzymol 456: 395-417.

Coen M, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK. 2008. NMR-based metabolic profiling and metabonomic approaches to problems in molecular toxicology. Chem Res Toxicol 21: 9-27.

Cohn JS, Rodriguez C, Jacques H, Tremblay M, Davignon J. 2004. Storage of human plasma samples leads to alterations in the lipoprotein distribution of apoC-III and apoE. J Lipid Research 45: 1572-1579.

Combourieu B. 2007. Du métabolisme au métabolome : complémentarité des approches par RMN et spectrométrie de masse. Spectra Analyses 257: 20-24.

Cordier S, Garlantezec R, Labat L, Rouget F, Monfort C, Bonvallot N, et al. 2012. Exposure during pregnancy to glycol ethers and chlorinated solvents and the risk of congenital malformations. Epidemiology 23: 806-812.

Cottret L, Wildridge D, Vinson F, Barrett MP, Charles H, Sagot M-F, et al. 2010. MetEplore: a web server to link metabolomic experiments and genome-scale metabolic networks. Nucleic Acids Res 38: W132-W137.

Courant F, Antignac JP, Monteau F, Jorgensen N, Juul A, Skakkebaek N, et al. 2008. Développement et application d'une approche métabolomique par LC-ESILTQ-OrbitrapTM pour l'étude de troubles de la reproduction chez l'homme liés à une exposition aux perturbateurs endocriniens. 3èmes Journées Scientifiques du Réseau Français de Métabolomique et Fluxomique (RFMF), Centre de génomique fonctionnelle de Bordeaux, Université Bordeaux 2, 7-8/02/2008. http://www.bordeaux.inra.fr/ifr103/reseau_metabolome/accueil.htm/.

Davies H. 2009. A Role for "Omics" Technologies in Food Safety Assessment? Food Control 21(12): 1601-1610.

De Flamingh JP, Van der Merwe JV. 1984. A serum biochemical profile of normal pregnancy. South African Medical Journal 65: 552-555.

de Siqueira MT, Braga C, Cabral-Filho JE, Augusto LG, Figueiroa JN, Souza AI. 2010. Correlation between pesticide use in agriculture and adverse birth outcomes in Brazil: an ecological study. Bull Environ Contam Toxicol 84: 647-651.

Deprez S, Sweatman BC, Connor SC, Haselden JN, Waterfield CJ. 2002. Optimisation of collection, storage and preparation of rat plasma for 1H NMR spectroscopic analysis in toxicology studies to determine inherent variation in biochemical profiles. J Pharm Biomed Anal 30: 1297-1310.

Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD. 2007. Mass spectrometry-based metabolomics. Mass Spectrom Rev 26: 51-78.

Dewulf EM, Cani PD, Claus SP, Fuentes S, Puylaert PGB, Neyrinck AM, et al. 2013. Insight into the prebiotic concept: lessons from an exploratory, double blind intervention study with inulin-type fructans in obese women. Gut 62: 1112-1121.

Diaz SO, Pinto J, Graça G, Duarte IF, Barros AS, Galhano E, et al. 2011. Metabolic biomarkers of prenatal disorders: an exploratory NMR metabonomics study of 2nd trimester maternal urine and blood plasma. J Proteome Res 10: 3732-3742.

Diaz SO, Barros AS, Goodfellow BJ, Duarte IF, Galhano E, Pita C, et al. 2013. Second trimester maternal urine for the diagnosis of trisomy 21 and prediction of poor pregnancy outcomes. J Proteome Res 12(6): 2946-2957.

Dilly SA. 1984. Scanning Electron-Microscope Study of the Development of the Human Respiratory Acinus. Thorax 39: 733-742.

Direction Régionale Bretagne de l'alimentation de l'agriculture et de la forêt (DRAAF). 2009. Enquête sur les pratiques culturales en 2006. Ministère de l'Agriculture et de la Pêche. Agreste Bretagne 3: 1-4. http://agreste.agriculture.gouv.fr/.

Domange C, Canlet C, Traore A, Bielicki G, Keller C, Paris A, et al. 2008. Orthologous metabonomic qualification of a rodent model combined with magnetic resonance imaging for an integrated evaluation of the toxicity of Hypochoeris radicata. Chem Res Toxicol 21: 2082-2096.

Dudka I, Kossowska B, Senhadri H, Latajka R, Hajek J, Andrzejak R, Antonowicz-Juchniewicz J, Gancarz R. 2014. Metabolonomic analysis of serum workers occupationally exposed to arsenic, cadmium and lead for biomarker research: A preliminary study. Environ Int 68: 71-81.

Dugas J, Nieuwenhuijsen MJ, Martinez D, Iszatt N, Nelson P, Elliott P. 2010. Use of biocides and insect repellents and risk of hypospadias. Occup Environ Med 67: 196-200.

Dumas ME, Maibaum EC, Teague C, Ueshima H, Zhou B, Lindon JC, et al. 2006. Assessment of analytical reproducibility of 1H NMR spectroscopy based metabonomics for large-scale epidemiological research: the INTERMAP Study. Anal Chem 78: 2199-2208.

Dunn WB, Broadhurst D, Ellis DI, Brown M, Halsall A, O'Hagan S, et al. 2008. A GC-TOF-MS study of the stability of serum and urine metabolomes during the UK Biobank sample collection and preparation protocols. Int J Epidemiol 37 Suppl 1: i23-i30.

Dunn WB, Bailey NJC, Johnson HE. 2005. Measuring the metabolome: current analytical technologies. Analyst 130: 606-625.

Duyzer J. 2003. Pesticide concentrations in air and precipitation in the Netherlands. J Environ Monit 5: 77N-80N.

Ellis J, Athersuch T, Thomas L, Teichert F, Perez-Trujillo M, Svendsen C, et al. 2012. Metabolic profiling detects early effects of environmental and lifestyle exposure to cadmium in a human population. BMC Medicine 10: 61.

Eskenazi B, Huen K, Marks A, Harley KG, Bradman A, Barr DB, et al. 2010. PON1 and neurodevelopment in children from the CHAMACOS study exposed to organophosphate pesticides in utero. Environ Health Perspect 118: 1775-1781.

Eskenazi B, Rosas LG, Marks AR, Bradman A, Harley K, Holland N, et al. 2008. Pesticide Toxicity and the Developing Brain. Basic Clin Pharmacol Toxicol 102: 228-236.

Fanos V, Antonucci R, Atzori L. Metabolomics in the developing infant. 2013. Cur Opin Pediatr 25(5): 604-611.

Ferguson KK, O'Neill MS, Meeker JD. 2013. Environmental contaminant exposures and preterm birth: a comprehensive review. J Toxicol Environ Health B Crit Rev 16: 69-113.

Fiehn O. 2002. Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. Plant Mol Biol 48: 151-171.

Floegel A, Wientzek A, Bachlechner U, Jacobs S, Drogan D, Prehn C et al. 2014. Linking diet, physical activity, cardiorespiratory fitness and obesity to serum metabolite networks: findings from a population-based study. Int J Obesity 1: 9. doi: 10.1038/ijo.2014.39.

Fournier J. 1999. Les pesticides: poisons ou bénédiction? L'actualité chimique 225: 34-39.

Franco R, Li S, Rodriguez-Rocha U, Bruns M, Panayiotidis MI. 2010. Molecular mechanisms of pesticide-induced neurotoxicity: relevance to Parkinson's disease. Chem Biol Interact 188: 289-300.

Fréry N, Guldner L, Saoudi A, Garnier R, Zeghnoun A, Bidondo ML. 2013. Exposition de la population française aux substances chimiques de l'environnement. Tome 2: polychlorobiphényles (PCB-NDL) et pesticides. Saint Maurice, Institut de veille sanitaire. 178 pages.

Fukuto TR. 1990. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. Environ Health Perspect 87: 245-254.

Garlantezec R, Monfort C, Rouget F, Cordier S. 2009. Maternal occupational exposure to solvents and congenital malformations: a prospective study in the general population. Occup Environ Med 66: 456-463.

Garlantézec R, Warembourg C, Monfort C, Labat L, Pulkkinen J, Bonvallot N, et al. 2013. Urinary glycol ether metabolites in women and time to pregnancy: the PELAGIE cohort. Environ Health Perspect 121(10): 1167-1173.

Gavaghan CL, Wilson ID, Nicholson JK. 2002. Physiological variation in metabolic phenotyping and functional genomic studies: use of orthogonal signal correction and PLS-DA. FEBS Letters 530: 191-196.

Gavaghan CL, Holmes E, Lenz E, Wilson ID, Nicholson JK. 2000. An NMR-based metabonomic approach to investigate the biochemical consequences of genetic strain differences: application to the C57BL10J and Alpk:ApfCD mouse. FEBS Letters 484: 169-174.

Goglia F, Moreno M, Lanni A. 1999. Action of thyroid hormones at the cellular level: the mitochondrial target. FEBS Letters 452:115-120.

González-Alzaga B, Lacasaña, M., Aguilar-Garduño C, Rodríguez-Barranco M, Ballester F, et al. 2013. A systematic review of neurodevelopmental effects of prenatal and postnatal organophosphate pesticide exposure. Toxicology Letters in press. doi 10.1016/j.toxlet. 2013.11.019.

Graça G, Duarte IF, Barros AS, Goodfellow BJ, Diaz S, Carreira IM, et al. 2009. 1H NMR based metabonomics of human amniotic fluid for the metabolic characterization of fetus malformations. J Proteome Res 8: 4144-4150.

Graillot V, Takakura N, Hegarat LL, Fessard V, Audebert M, Cravedi JP. 2012. Genotoxicity of pesticide mixtures present in the diet of the French population. Environ Mol Mutagen 53: 173-184.

Grandjean P, Bellinger D, Bergman A, Cordier S, vey-Smith G, Eskenazi B, et al. 2008. The faroes statement: human health effects of developmental exposure to chemicals in our environment. Bas Clin Pharmacol Toxicol 102: 73-75.

Green BJ, Vorhees DJ, Melly SJ, Swedis SR, Drivas PJ, Rudel RA. 2002. Using GIS and historical records to reconstruct residential exposure to large-scale pesticide application. J Expo Anal Environ Epidemiol 12: 64-80.

Greenamyre JT, Betarbet R, Sherer TB. 2003. The rotenone model of Parkinson's disease: genes, environment and mitochondria. Parkinsonism and Related Disorders 9 (Suppl2): S59-S64.

Grether JK, Harris JA, Neutra R, Kizer KW. 1987. Exposure to aerial malathion application and the occurrence of congenital anomalies and low birthweight. Am J Public Health 77: 1009-1010.

Griswold MD. 1998. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. Semin Cell Dev Biol 9: 411-416.

Gu H, Pan Z, Xi B, Asiago V, Musselman B, Raftery D. 2011. Principal component directed partial least squares analysis for combining nuclear magnetic resonance and mass spectrometry data in metabolomics: application to the detection of breast cancer. Analytica Chimica Acta 686: 57-63.

Gu H, Pan Z, Xi B, Hainline BE, Shanaiah N, Asiago V, et al. 2009. 1H NMR metabolomics study of age profiling in children. NMR Biomed 22: 826-833.

Guerrero-Bosagna C, Settles M, Lucker B, Skinner MK. 2010. Epigenetic transgenerational actions of vinclozolin on promoter regions of the sperm epigenome. PLoS ONE 5: e13100.

Guichard L. 2009. Utilisation des produits phytosanitaires en France en grandes cultures. In. Colloque de restitution de l'Observatoire des Résidus de Pesticides: Mieux connaître les usages des pesticides pour comprendre les expositions. 11-12 mars 2009. Paris

Guldner L, Monfort C, Rouget F, Garlantezec R, Cordier S. 2007. Maternal fish and shellfish intake and pregnancy outcomes: a prospective cohort study in Brittany, France. Envi Health 6: 33.

Gunier RB, Ward MH, Airola M, Bell EM, Colt J, Nishioka M, et al. 2011. Determinants of agricultural pesticide concentrations in carpet dust. Environ Health Perspect 119: 970-976.

Harley KG, Huen K, Aguilar SR, Holland NT, Bradman A, Barr DB, et al. 2011. Association of organophosphate pesticide exposure and paraoxonase with birth outcome in Mexican-American women. PLoS ONE 6: e23923.

Heazell AEP, Brown M, Dunn WB, Worton SA, Crocker IP, Baker PN, et al. 2008. Analysis of the metabolic footprint and tissue metabolome of placental villous explants cultured at different oxygen tensions reveals novel redox biomarkers. Placenta 29: 691-698.

Hochoa-Acuna H, Frankenberger J, Leighanne H, Carbajo C. 2009. Drinking-water herbicide exposure in Indiana and prevalence of small-for-gestational-age and preterm delivery. Environ Health Perspect 117: 1619-1624.

Hoekenga OA. 2008. Using metabolomics to estimate unintended effects in transgenic crop plants: problems, promises, and opportunities. J Biomol Techniques 19: 159-166.

Hollingworth R.M. 2010. Chapter 57: inhibitors and uncouplers of mitochondrial oxidative phosphorylation. In: Handbook of pesticide toxicology. Third edition. Robert Krieger. p1169-1262.

Holmes E, Loo RL, Stamler J, Bictash M, Yap IK, Chan Q, et al. 2008. Human metabolic phenotype diversity and its association with diet and blood pressure. Nature 453: 396-400.

Horgan RP, Clancy OH, Myers JE, Baker PN. 2009. An overview of proteomic and metabolomic technologies and their application to pregnancy research. BJOG 116: 173-181.

Hung Ph, Froenicke L, Lin CY, Lyons LA, Miller MG, Pinkerton KE, et al. 2009. Effects of environmental tobacco smoke in vivo on rhesus monkey semen quality, sperm function, and sperm metabolism. Reprod Toxicol 27(2): 140-148.

Institut National de la Recherche Médicale. 2013. Pesticides : effets sur la santé, une Expertise Collective de l'INSERM. Synthèse et recommandations. 162 pages.

Irvine DS. 2001. Changing male reproductive health: a review of the clinical evidence? Human Ecological Risk Assessment 7: 1003-1016.

Issaq HJ, Blonder J. 2009. Electrophoresis and liquid chromatography/tandem mass spectrometry in disease biomarker discovery. J Chromato B 877(13): 1222-1228.

Jamin E, Bonvallot N., Tremblay-Franco M, Cravedi JP, Chevrier C, Cordier S, et al. 2014. Untargeted profiling of pesticide metabolites by LC-HRMS: an exposomics tool for human exposure evaluation. Anal Bioanal Chem 406: 1146-1161.

Jaremek M, Yu Z, Mangino M, Mittelstrass K, Prehn C, Singmann P et al. 2013. Alcohol-induced metabonomic differences in humans. Transl Psychiatry 3: e276.

Jones OA, Murfitt S, Svendsen C, Turk A, Turk H, Spurgeon DJ, et al. 2013. Comparisons of metabolic and physiological changes in rats following short term oral dosing with pesticides commonly found in food. Food Chem Toxicol 59: 438-445.

Karami-Mohajeri S, Abdollahi M. 2013. Mitochondrial dysfunction and organophosphorus compounds. Toxicol Appl Pharmacol 270: 39-44.

Kettunen J, Tukiainen T, Sarin A-P, Ortega-Alonso A, Tikkanen E, Lyytikäinen L-P, et al. 2012. Genome-wide association study identifies multiple loci influencing human serum metabolite levels. Nature Genetics 44(3): 269-276.

Keum YS, Kim J-H, Li QX. 2010. Chapter 22. Metabolomics in pesticide toxicology. In: Handbook of pesticide toxicology. Third edition. Robert Krieger. p627-643.

Keun HC, Athersuch TJ. 2007. Application of metabonomics in drug development. Pharmacogenomics 8: 731-741.

Keurentjes JJ. 2009. Genetical metabolomics: closing in on phenotypes. Curr Opin Plant Biol 12(2): 223-230.

Kezios KL, Liu X, Cirillo PM, Cohn BA, Kalantzi OI, Wang Y, et al. 2013. Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT), DDT metabolites and pregnancy outcomes. Reprod Toxicol 35: 156-164.

Kim KB, Kim SH, Um SY, Chung MW, Oh JS, Jung SC, et al. 2009. Metabolomics approach to risk assessment: methoxyclor exposure in rats. J Toxicol Environ Health A 72: 1352-1368.

Kim KB, Um SY, Chung MW, Jung SC, Oh JS, Kim SH, et al. 2010. Toxicometabolomics approach to urinary biomarkers for mercuric chloride (HgCl2)-induced nephrotoxicity using proton nuclear magnetic resonance (1H NMR) in rats. Toxicol Appl Pharmacol 249: 114-126.

Kim K, Mall C, Taylor SL, Hitchcock S, Zhang C, Wettersten HI, Jones AD, Chapman A, Weiss RH. 2014. Mealtime, temporal, and daily variability of the human urinary and plasma metabolomes in a tightly controlled environment. PloS ONE 9(1): e86223.

Kitteringham NR, Jenkins RE, Lane CS, Elliott VL, Park BK. 2009. Multiple reaction monitoring for quantitative biomarker analysis in proteomics and metabolomics. J Chromato B 877(13): 1229-1239.

Kochhar S, Jacobs DM, Ramadan Z, Berruex F, Fuerholz A, Fay LB. 2006. Probing gender-specific metabolism differences in humans by nuclear magnetic resonance-based metabonomics. Anal Biochem 352: 274-281.

Koutroulakis D, Sifakis S, Tzatzaraki MN, Alegaki AK, Theodoropoulou E, Kavvalaki MP, Kappou D, Tsatsakis AM. 2014. Dialkyl phosphates in amniotic fluid as a biomarker of fetal exposure to organophosphates in Crete, Greece; association with fetal growth. Reprod Tox 46: 98-105.

Lacasana M, Lopez-Flores I, Rodriguez-Barranco M, Aguilar-Garduno C, Blanco-Munoz J et al. 2010. Association between organophosphate pesticides exposure and thyroid hormones in floriculture workers. Toxicol Appl Pharmacol 243(1): 19-26.

Lambadiari V, Mitrou P, Maratou E, Raptis A.E, Tountas N, Raptis S.A, et al. 2011. Thyroid hormones are positively associated with insulin resistance early in the development of type 2 diabetes. Endocrine 39 : 28-32.

Larsson A, Palm M, Hansson LO, Axelsson O. 2008. Reference values for clinical chemistry tests during normal pregnancy. BJOG 115: 874-881.

Lee HK. 2011. Mitochondrial dysfunction and insulin resistance: the contribution of dioxin-like substances. J Diabetes metab 35: 207-215.

Lee JE, Park JH, Shin IC, Koh HC. 2012. Reactive oxygen species regulated mitochondria-mediated apoptosis in PC12 cells exposed to chlorpyrifos. Toxicol Appl Pharmacol 263: 148-162.

Lee DH, Porta M, Jacobs DR Jr, Vandenberg LN. 2014. Chlorinated Persistent Organic Pollutants, Obesity, and Type 2 Diabetes. Endocr Rev: er20131084.

Lenz EM, Bright J, Wilson ID, Morgan SR, Nash AF. 2003. A 1H NMR-based metabonomic study of urine and plasma samples obtained from healthy human subjects. J Pharm Biomed Anal 33: 1103-1115.

Lenz EM, Bright J, Wilson ID, Hughes A, Morrisson J, Lindberg H, et al. 2004. Metabonomics, dietary influences and cultural differences: a 1H NMR-based study of urine samples obtained from healthy British and Swedish subjects. J Pharm Biomed Anal 36: 841-849.

Levario-Carrillo M, Amato D, Ostrosky-Wegman P, Gonzalez-Horta C, Corona Y, Sanin LH. 2004. Relation between pesticide exposure and intrauterine growth retardation. Chemosphere 55: 1421-1427.

Liang YJ, Wang HP, Yang L, Li W, Wu YJ. 2012a. Metabonomic responses in rat urine following subacute exposure to propoxur. Int J Toxicol 31: 287-293.

Liang YJ, Wang HP, Long DX, Wu YJ. 2012b. (1)H NMR-based metabonomic profiling of rat serum and urine to characterize the subacute effects of carbamate insecticide propoxur. Biomarkers 17: 566-574.

Liang YJ, Wang HP, Long DX, Wu YJ. 2012c. Applying biofluid metabonomic techniques to analyze the combined subchronic toxicity of propoxur and permethrin in rats. Bioanalysis 4: 2897-2907.

Lim S, Ahn SY, Song IC, Chung MH, Jang HC, Park KS, et al. 2009. Chronic exposure to the herbicide, atrazine, causes mitochondrial dysfunction and insulin resistance. PLoS ONE 4: e5186.

Lin CY, Hung Ph, VandeVoort CA, Miller MG. 2009. 1H NMR to Investigate Metabolism and Energy supply in Rhesus Macaque Sperm. Reprod Toxicol 28: 75-80.

Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. 2007. Metabonomics in pharmaceutical R&D. The FEBS Journal 274: 1140-1151.

Lindon JC, Nicholson JK. 2008. Analytical techniques for metabonomics and metabolomics, and multi-omic information recovery. Trends Anal Chem 27: 194-204.

Loewenherz C, Fenske RA, Simcox NJ, Bellamy G, Kalman D. 1997. Biological monitoring of organophosphorus pesticide exposure among children of agricultural workers in central Washington State. Environ Health Perspect 105: 1344-1353.

Loffredo CA, Silbergeld EK, Ferencz C, Zhang J. 2001. Association of transposition of the great arteries in infants with maternal exposures to herbicides and rodenticides. Am J Epidemiol 153: 529-536.

London L, Beseler C, Bouchard MF, Bellinger DC, Colosio C, Grandjean P, et al. 2012. Neurobehavioral and neurodevelopmental effects of pesticide exposures. Neurotoxicology 33: 887-896.

Longhi S, Radetti G. 2013. Thyroid Function and Obesity. J Clin Res Pediatr Endocrinol 5(Suppl 1): 40-44.

Lu C, Fenske RA, Simcox NJ, Kalman D. 2000. Pesticide exposure of children in an agricultural community: evidence of household proximity to farmland and take home exposure Pathways. Environ Res 84: 290-302.

Maher AD, Zirah SF, Holmes E, Nicholson JK. 2007. Experimental and analytical variation in human urine in 1H NMR spectroscopy-based metabolic phenotyping studies. Anal Chem 79: 5204-5211.

Mamelle N, Cochet V, Claris O. 2001. Definition of fetal growth restriction according to constitutional growth potential. Biology Neonate 80: 277-285.

Mamelle N, Munoz F, Grandjean H. 1996a. Fetal growth from the AUDIPOG study. I. Establishment of reference curves. Journal de Gynécologie, Obstétrique et Biologie de la Reproduction 25: 61-70.

Mamelle N, Munoz F, Martin JL, Laumon B, Grandjean H. 1996b. Fetal growth from the AUDIPOG study. II. Application for the diagnosis of intrauterine growth retardation. Journal de Gynécologie, Obstétrique et Biologie de la Reproduction 25: 71-77.

Marks AR, Harley K, Bradman A, Kogut K, Barr DB, Johnson C, et al. 2010. Organophosphate pesticide exposure and attention in young Mexican-American children: The CHAMACOS study. Environ Health Perspect 118: 1768-1774.

Martin JC, Canlet C, Delplanque B, Agnani G, Lairon D, Gottardi G, et al. 2009. 1H NMR metabonomics can differentiate the early atherogenic effect of dairy products in hyperlipidemic hamsters. Atherosclerosis 206: 127-133.

Mattix KD, Winchester PD, Scherer LR. 2007. Incidence of abdominal wall defects is related to surface water atrazine and nitrate levels. J Pediatr Surg 42: 947-949.

McKinley R, Plant JA, Bell JNB, Voulvoulis N. 2008. Endocrine disrupting pesticides, Implications for risk assessment. Environ Int 34: 168-183.

Merhi M, Demur C, Racaud-Sultan C, Bertrand J, Canlet C, Estrada FB, et al. 2010. Gender-linked haematopoietic and metabolic disturbances induced by a pesticide mixture administered at low dose to mice. Toxicology 267: 80-90.

Meyer KJ, Reif JS, Veeramachaneni DNR, Luben TJ, Mosley BS, Nuckols JR. 2006. Agricultural pesticide use and hypospadias in eastern Arkansas. Environmental Health Perspectives 114: 1589-1595.

Miller MD, Crofton KM, Rice DC, Zoeller RT. 2009. Thyroid-disrupting chemicals: interpreting upstream biomarkers of adverse outcomes. Environ Health Perspect 117(7): 1033-1041.

Mnif W, Hassine AI, Bouaziz A., Bartegi A., Thomas O, Roig B. 2011. Effect of endocrine disruptor pesticides: a review. Int J Environ Res Public Health 8: 2265-2303.

Montesano MA, Olsson AO, Kuklenyik P, Needham LL, Bradman ASA, Barr DB. 2007. Method for determination of acephate, methamidophos, omethoate, dimethoate, ethylenethiourea and propylenethiourea in human urine using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. J Expos Sci Environ Epidemiol 17: 321-330.

Mostafalou S, Abdollahi M. 2013. Pesticides and human chronic diseases: evidences, mechanisms, and perspectives. Toxicol Appl Pharmacol 268: 157-177.

Mostafalou S, Eghbal MA, Nili-Ahmadabadi A, Baeeri M, Abdollahi M. 2012. Biochemical evidence on the potential role of organophosphates in hepatic glucose metabolism toward insulin resistance through inflammatory signaling and free radical pathways. Toxicol Ind Health 28: 840-851.

Munoz-Quezada MT, Lucero BA, Barr DB, Steenland K, Levy K, Ryan PB, et al. 2013. Neurodevelopmental effects in children associated with exposure to organophosphate pesticides: a systematic review. Neurotoxicology 39: 158-168.

Munoz-Quezada MT, Iglesias V, Lucero B, Steenland K, Barr DB, Levy K, et al. 2012. Predictors of exposure to organophosphate pesticides in schoolchildren in the Province of Talca, Chile. Environ Int 47: 28-36.

Nava SI, Bocconi LU, Zuliani GU, Kustermann AL, Nicolini UM. 1996. Aspects of fetal physiology from 18 to 37 weeks' gestation as assessed by blood sampling. Obst & Gynecology 87(6):975-980.

Nicholson JK, Buckingham MJ, Sadler PJ. 1983. High Resolution Proton NMR Studies of Vertebrate Blood and Plasma. Biochem J 211: 605-615.

Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 1999. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. Xenobiotica 29: 1181-1189.

Nicholson JK, Timbrell JA, Sadler PJ. 1985. Proton NMR Spectra of Urine as Indicators of Renal Damage: Mercury Nephrotoxicity in Rats. Molec Pharmacol 27: 644-651.

OCDE (Organization of Economic Co-operation and Development). 1981. Guidelines for the testing of chemicals. Section 4: health effects. http://www.oecd-ilibrary.org/.

Ogata H, Goto S, Fujibuchi W, Kanehisa M. 1998. Computation with the KEGG pathway database. Biosystems 47(1-2): 119-128.

Ojha A, Srivastava N. 2014. In vitro studies on organophosphate pesticides induced oxidative DNA damage in rat lymphocytes. Mutation Res 761: 10-17.

Olsson AO, Baker SE, Nguyen JV, Romanoff LC, Udunka SO, Walker RD, 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. Anal Chem 76: 2453-2461.

O'Sullivan A, Gibney MJ, Brennan L. 2011. Dietary intake patterns are reflected in metabolomic profiles: potential role in dietary assessment studies. Am J Clin Nutr 93(2):314-321.

Osmond C, Barker DJP. 2000. Fetal, infant, and childhood growth are predictors of coronary heart disease, diabetes, and hypertension in adult men and women. Environ Health Perspect 108: 545-553.

Ostrea EM, Jr., Reyes A, Villanueva-Uy E, Pacifico R, Benitez B, Ramos E, et al. 2012. Fetal exposure to propoxur and abnormal child neurodevelopment at 2 years of age. Neurotoxicology 33: 669-675.

Pathak R, Mustafa MD, Ahmed T, Ahmed R, Tripathi AK, Guleria K, et al. 2011. Intra uterine growth retardation: association with organochlorine pesticide residue levels and oxidative stress markers. Reprod Toxicol 31: 534-539.

Pelé F, Bajeux E, Gendron H, Monfort C, Rouget F, Multigner L, Viel JF, Cordier S. 2013. Maternal fish and shellfish consumption and wheeze, eczema and food allergy at age two: a prospective cohort study in Brittany, France. Environ Health 12: 102.

Petersen A-K, Zeilinger S, Kastenmüller G, Römisch-Margl W, Brugger M, Peters A, et al. 2014. Epigenetics meets metabolomics: an epigenome-wide association study with blood serum metabolic traits. Human Molec Genetics 23(2):534-545.

Petit C, Chevrier C, Durand G, Monfort C, Rouget F, Garlantezec R, et al. 2010. Impact on fetal growth of prenatal exposure to pesticides due to agricultural activities: a prospective cohort study in Brittany, France. Environ Health 9: 71.

Polanska K, Jurewicz J, Hanke W. 2013. Review of current evidence on the impact of pesticides, polychlorinated biphenyls and selected metals on attention deficit / hyperactivity disorder in children. Int J Occup Med Environ Health 26: 16-38.

Proenca P, Teixeira H, Castanheira F, Pinheiro J, Monsanto PV, Marques EP, et al. 2005. Two fatal intoxication cases with imidacloprid: LC/MS analysis. Forensic Sci International 153: 75-80.

Psihogios NG, Gazi IF, Elisaf MS, Seferiadis KI, Bairaktari ET. 2008. Gender-related and age-related urinalysis of healthy subjects by NMR-based metabonomics. NMR Biomed 21: 195-207.

Rauch SA, Braun JM, Barr DB, Calafat AM, Khoury J, Montesano MA, et al. 2012. Associations of prenatal exposure to organophosphate pesticide metabolites with gestational age and birth weight. Environ Health Perspect 120(7):1055-1060.

Rauh V, Arunajadai S, Horton M, Perera F, Hoepner L, Barr DB, et al. 2011. Seven-year neurodevelopmental scores and prenatal exposure to chlorpyrifos, a common agricultural pesticide. Environ Health Perspect 119: 1196-1201.

Rauh VA, Garfinkel R, Perera FP, Andrews HF, Hoepner L, Barr DB, et al. 2006. Impact of prenatal chlorpyrifos exposure on neurodevelopment in the first 3 years of life among inner-city children. Pediatrics 118: e1845-e1859.

Reynolds P, Von BJ, Gunier RB, Goldberg DE, Hertz A, Harnly ME. 2002. Childhood cancer and agricultural pesticide use: an ecologic study in California. Environ Health Perspect 110: 319-324.

Rice PJ, Rice PJ, Arthur EL, Barefoot AC. 2007. Advances in Pesticide Environmental Fate and Exposure Assessments. J Agric Food Chem 55: 5367-5376.

Ross A, Schlotterbeck G, Dieterle F, Senn H. 2007. NMR spectroscopy techniques for application to metabonomics. In: The Handbook of Metabonomics and Metabolomics, 55-112.

Salm P, Taylor PJ, Roberts D, de Silva J. 2009. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantitative determination of the organophosphorus pesticides dimethoate, fenthion, diazinon and chlorpyrifos in human blood. J Chromato B 877: 568-574.

Sams C, Patel K, Jones K. 2010. Biological monitoring for exposure to pirimicarb: Method development and a human oral dosing study. Toxicol Letters 192: 56-60.

Shafer TJ, Meyer DA, Crofton KM. 2005. Developmental Neurotoxicity of Pyrethroid Insecticides: Critical Review and Future Research Needs. Environ Health Perspect 113: 123-136.

Sharma E, Mustafa M, Pathak R, Guleria K, Ahmed RS, Vaid NB, et al. 2012. A case control study of gene environmental interaction in fetal growth restriction with special reference to organochlorine pesticides. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 161: 163-169.

Shaw GM, Wasserman CR, O'Malley CD, Nelson V, Jackson RJ. 1999. Maternal pesticide exposure from multiple sources and selected congenital anomalies. Epidemiology 10: 60-66.

Shelton JF, Hertz-Picciotto I, Pessah I. 2012. Tipping the balance of autism risk: potential mechanisms linking pesticides and autism. Environ Health Perspect 120: 944-951.

Shirangi A, Nieuwenhuijsen M, Vienneau D, Holman CD. 2011. Living near agricultural pesticide applications and the risk of adverse reproductive outcomes: a review of the literature. Paediatric Perinatal Epidemiology 25: 172-191.

Skakkebaek NE, Jorgensen N, Main KM, Meyts ER-D, Leffers H, Andersson AM, et al. 2006. Is human fecundity declining? Int J Andrology 29: 2-11.

Slotkin TA. 2004. Cholinergic systems in brain development and disruption by neurotoxicants: nicotine, environmental tobacco smoke, organophosphates. Toxicol Appl Pharmacol 198: 132-151.

Slotkin TA. 2011. Does early-life exposure to organophosphate insecticides lead to prediabetes and obesity? Reprod Toxicol 31(3):297-301.

Slupsky CM, Rankin KN, Wagner J, Fu H, Chang D, Weljie AM, et al. 2007. Investigations of the effects of gender, diurnal variation, and age in human urinary metabolomic profiles. Anal Chem 79:6995-7004.

Soboll S. 1993. Thyroid hormone action on mitochondrial energy transfer. Biochim Biophys Acta 1144:1-16.

Soderlund DM, Clark JM, Sheets LP, Mullin LS, Piccirillo VJ, Sargent D, et al. 2002. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. Toxicology 171: 3-59.

Soderlund D.M. 2010. Chapter 77: Toxicology and mode of action of pyrethroids insecticides. Section XI: Pyrethrins and pyrethroids. In: Handbook of pesticide toxicology. Third Edition. Robert Krieger. p1665-1686.

Song C, Kanthasamy A, Anantharam V, Sun F, Kanthasamy AG. 2010. Environmental neurotoxic pesticide increases histone acetylation to promote apoptosis in dopaminergic neuronal cells: relevance to epigenetic mechanisms of neurodegeneration. Molec Pharmacol 77: 621-632.

Suhre K, Shin S-Y, Petersen A-K, Mohney R.P, Meredith D, Wägele B et al. 2011. Human metabolic individuality in biomedical and pharmaceutical research. Nature 477:54-62.

Sun J, Schnackenberg L, Pence L, Bhattacharyya S, Doerge D, Bowyer J, et al. 2010. Metabolomic analysis of urine from rats chronically dosed with acrylamide using NMR and LC/MS. Metabolomics 6: 550-563.

Tanner CM, Kamel F, Ross GW, Hoppin JA, Goldman SM, Korell M, Marras C, Bhudhikanok GS, Kasten M, Chade AR, Comyns K, Richards MB, Meng C, Priestley B, Fernandez HH, Cambi F, Umbach DM, Blair A, Sandler DP, Langston JW. 2011. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. Environ Health Perspect ;119(6):866-872.

Thomas DC, Petitti DB, Goldhaber M, Swan SH, Rappaport EB, Hertz-Picciotto I. 1992. Reproductive outcomes in relation to malathion spraying in the San Francisco Bay Area, 1981-1982. Epidemiology 3: 32-39.

Um SY, Chung MW, Kim KB, Kim SH, Oh JS, Oh HY, et al. 2009. Pattern recognition analysis for the prediction of adverse effects by nonsteroidal anti-Inflammatory drugs using 1H NMR-based metabolomics in rats. Anal Chem 81: 4734-4741.

Waldram A, Holmes E, Wang Y, Rantalainen M, Wilson ID, Tuohy KM, et al. 2009. Top-down systems biology modeling of host metabotype-microbiome associations in obese rodents. J Proteome Res 8: 2361-2375.

Waller SA, Paul K, Peterson SE, Hitti JE. 2010. Agricultural-related chemical exposures, season of conception, and risk of gastroschisis in Washington State. Am J Obstet Gynecol 202: 241-246.

Wang HP, Liang YJ, Long DX, Chen JX, Hou WY, Wu YJ. 2009. Metabolic Profiles of Serum from rats after subchronic exposure to chlorpyrifos and carbaryl. Chem Res Toxicol 22: 1026-1033.

Wang HP, Liang YJ, Sun YJ, Chen JX, Hou WY, Long DX, et al. 2013. 1H NMR-based metabonomic analysis of the serum and urine of rats following subchronic exposure to dichlorvos, deltamethrin, or a combination of these two pesticides. Chem Biol Interact 203: 588-596.

Wang HP, Liang YJ, Zhang Q, Long DX, Li W, Li L, et al. 2011. Changes in metabolic profiles of urine from rats following chronic exposure to anticholinesterase pesticides. Pesticide Biochemistry and Physiology 101: 232-239.

Wang P, Tian Y, Wang XJ, Gao Y, Shi R, Wang GQ, et al. 2012. Organophosphate pesticide exposure and perinatal outcomes in Shanghai, China. Environ Int 42: 100-104.

Wang Y, Holmes E, Tang H, Lindon JC, Sprenger N, Turini ME, et al. 2006. Experimental metabonomic model of dietary variation and stress interactions. J Proteome Res 5: 1535-1542.

Ward MH, Lubin J, Giglierano J, Colt JS, Wolter C, Bekiroglu N, et al. 2006. Proximity to crops and residential exposure to agricultural herbicides in Iowa. Environ Health Perspect 114.

Warner M, Aguilar SR, Harley KG, Bradman A, Barr D, Eskenazi B. 2013. In utero DDT and DDE exposure and obesity status of 7-year-old Mexican-American children in the CHAMACOS cohort. Environ Health Perspect 121: 631-636.

Waters NJ, Holmes E, Waterfield CJ, Farrant RD, Nicholson JK. 2002. NMR and pattern recognition studies on liver extracts and intact livers from rats treated with alpha-naphthylisothiocyanate. Biochem Pharmacol 64: 67-77.

Werner E, Heilier JF, Ducruix C, Ezan E, Junot C, Tabet JC. 2008. Mass spectrometry for the identification of the discriminating signals from metabolomics: current status and future trends. J Chromatogr B 871: 143-163.

Wilson B.W. 2010. Chapter 68: Cholinesterase. Section X: orgapnophosphorous insecticides. In: Handbook of pesticide toxicology. Third Edition. Robert Krieger. p1457-1478.

Whyatt RM, Camann D, Perera FP, Rauh VA, Tang D, Kinney PL, et al. 2005. Biomarkers in assessing residential insecticide exposures during pregnancy and effects on fetal growth. Toxicol Appl Pharmacol 206: 246-254.

Whyatt RM, Rauh V, Barr DB, Camann DE, Andrews H, Garfinkel R, et al. 2004. Prenatal insecticide exposures and birth weight and length among an urban minority cohort. Environ Health Perspect 112(10):1125-1132.

Willis WO, de Peyster A, Molgaard CA, Walker C, MacKendrick T. 1993. Pregnancy outcome among women exposed to pesticides through work or residence in an agricultural area. J Occup Med 35: 943-949.

Wilson K, Hawken S, Ducharme R, Potter BK, Little J, Thébaud B, et al. 2014. Metabolomics of prematurity: analysis of patterns of amino acids, enzymes, and endocrine markers by categories of gestational age. Pediatr Res 75(2):367-373.

Wishart DS. 2008. Metabolomics: Application to Food Science and Nutrition Research. Trend Food Sci Technol 19: 482-493.

Wold S, Antti H, Lindgren F, Ohman J. 1998. Orthogonal signal correction of near-infrared spectra. Chemometrics Intelligent Lab Systems 44: 175-185.

Wong RL, Walker CL. 2013. Molecular pathways: environmental estrogens activate nongenomic signaling to developmentally reprogram the epigenome. Clin Cancer Res 19: 3732-3737.

Xiang H, Nuckols JR, Stallones L. 2000. A geographic information assessment of birth weight and crop production patterns around mother's residence. Environ Res 82: 160-167.

Xu T, Holzapfel C, Dong X, Bader E, Yu Z, Prehn C et al. 2013. Effects of smoking and smoking cessation on human serum metabolite profile: results from the KORA cohort study. BMC Med 11: 60.

Xue Z, Li X, Su Q, Xu L, Zhang P, Kong Z, et al. 2013. Effect of synthetic pyrethroid pesticide exposure during pregnancy on the growth and development of infants. Asia Pac J Public Health 25: 72S-79S.

Yang W, Carmichael S, Roberts EM, Kegley SE, Padula AM, English PB, Shaw GM. 2014. Residential agricultural pesticide exposures and risks of neural tube defects and orofacial clefts among offspinrg in the San Joaquin Valley of California. Am J Epidemiol 179(6): 740-748.

Zama AM, Uzumcu M. 2009. Fetal and neonatal exposure to the endocrine disruptor methoxychlor causes epigenetic alterations in adult ovarian genes. Endocrinology 150: 4681-4691.

Zhang Y, Wu B, Zhang ZY, Cheng SP. 2011. A metabonomic analysis on health effects of drinking water on male mice (Mus musculus). J Hazardous Materials 190: 515-519.

Zhang Y, Han S, Liang D, Shi X, Wang F, Liu W, Zhang L, Chen L, Gu Y, Tian Y. 2014. Prenatal exposure to organophosphate pesticides and neurobehavioral development of neonates: a birth cohort study in shenyang, china. PLoS ONE;9(2):e88491.

Zira AN, Theocharis SE, Mitropoulos D, Migdalis V, Mikros E. 2010. 1H NMR metabonomic analysis in renal cell carcinoma: a possible diagnostic tool. J Proteome Res 9: 4038-4044.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Stratégie chimiométrique

Préparation des échantillons

En fonction des fluides biologiques étudiés, la préparation des échantillons diffère. Pour les échantillons d'urine (humains, animaux), après décongélation à température ambiante et agitation (vortex), 500 µL d'urine ont été additionnés à 200 µL d'une solution de tampon phosphate (pH 7,39) préparée avec du D_2O et du 3-triméthylsilyl-1-[2,2,3,3,-$^2H_4$]-propionate de sodium (TSP, 1mM). La solution tampon est utilisée pour réduire les variations de déplacements chimiques liées aux différences de pH urinaires dans les spectres RMN. Le TSP sert de référence (déplacement chimique à 0 ppm) et le D_20 est utilisé pour stabiliser le champ magnétique du spectromètre. Chaque échantillon a été agité au vortex et centrifugé pendant 10 minutes à 8 000 tours par minute (rpm) pour retirer le précipité. Ensuite, des aliquotes de 600 µL ont été transvasés dans des tubes RMN standards de 5 mm de diamètre pour l'analyse.

Pour les échantillons de sérums (humains) ou de plasmas (animaux), après décongélation à température ambiante et agitation au vortex, 200 µL ont été ajoutés à 500 µL de D_20. Chaque échantillon a été agité au vortex et centrifugé pendant 10 minutes à 8 000 rpm puis 600 µL ont également été transvasés dans des tubes RMN pour l'analyse.

Pour les échantillons de foie et de cerveaux (animaux) : une extraction a été réalisée selon la méthode décrite par Waters *et al.* (Waters *et al.* 2002). Cent milligrammes de foie et le cerveau entier ont été broyés et homogénéisés au Polytron PT2100 sur un lit de glace, dans un mélange d'acétonitrile / eau (50/50, v/v) contenant 0,1 % de butylhydroxytoluène (BHT). Les homogénats ont ensuite été centrifugés à 5 000 rpm pendant 10 min à 4 °C. Le surnageant a été retiré et lyophilisé avant d'être reconstitué dans 600 µL de D_20 contenant 0,25 mM de TSP. Une solution de dichlorométhane / méthanol (75/25, v/v) a été ajoutée au culot et l'extraction a été suivie par une centrifugation (5 000 rpm, 15 min, 4 °C). Le surnageant lipophile a été retiré, séché sous un courant d'azote et reconstitué dans 600 µL de $CDCl_3$ puis transvasé dans un tube RMN.

Acquisitions spectrales

Tous les spectres RMN du proton ont été acquis à 300 K sur un spectromètre Bruker Avance DRX-600 opérant à 600,13 MHz (Bruker Biopsin, Allemagne), équipé d'un passeur automatique d'échantillons et d'une sonde cryogénique triple noyaux ^{1}H-^{13}C-^{15}N. Pour les échantillons d'urine, les spectres RMN ont été acquis à l'aide d'une séquence d'impulsion standard NOESY permettant de supprimer le signal de l'eau. Un délai de relaxation de 2 s et un temps de mélange de 150 ms ont été utilisés. 128 (échantillons humains) ou 256 (échantillons animaux) signaux de précession libre (FID) ont été collectés sur 32 K points de données avec une largeur spectrale de 20 ppm, et un temps d'acquisition de 3,36 s ou 1,36 s respectivement pour les données humaines ou animales.

Pour les échantillons de sérums (Homme), de plasma (animal) et les extraits aqueux tissulaires (foie et cerveau des animaux), les spectres RMN ont été acquis à l'aide de la séquence d'impulsion CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) permettant d'atténuer le signal des grosses molécules comme les protéines (temps d'écho respectif de 400 µs ou 240 ms pour les données humaines et animales). 128 FID ont été collectés sur 32 K points de données avec une largeur spectrale de 20 ppm, et un temps d'acquisition de 3,36 ou 1,36 s en fonction des données.

Pour les extraits lipidiques du foie et du cerveau des animaux, une séquence d'impulsion de 30 ° (zg30) a été utilisée. 128 FID ont été collectés sur 64 K points de données avec une largeur spectrale de 12 ppm, un délai de relaxation de 5 s et un temps d'acquisition de 4,56 s.

L'acquisition de ces spectre a été réalisée par Cécile Canlet (INRA UMR 1331, Toulouse).

Prétraitement des données et bucketing

Après Transformée de Fourier, les spectres ont été phasés et calibrés et la ligne de base a été corrigée manuellement à l'aide des logiciels Topspin (V2.1, Bruker Biospin, Allemagne) ou ACD/NMR processor (édition académique). Les régions spectrales correspondant aux signaux de l'eau, de l'urée et des solvants ont été retirées et les spectres ont été numérisés par la technique du bucketing avec un intervalle de 0,01 ppm (découpage des spectres en régions spectrales de 0,01 ppm), avec le logiciel AMIX (V3.9.11, Bruker Biospin, Allemagne), conduisant à l'obtention de 469 à 766 variables (en fonction du milieu biologique analysé).

Chaque bucket est intégré puis normalisé par rapport à l'intensité totale du spectre afin de réduire les différences de concentration entre les échantillons. Pour certains métabolites (lipides), une intégration spécifique des signaux a été effectuée en vue d'une analyse complémentaire. Ce bucketing a été réalisé par Cécile Canlet (INRA UMR 1331, Toulouse).

Les données numérisées ont ensuite été importées dans le logiciel SIMCA-P+ (version 12.0, Umetrics).

Les données humaines et une partie des données animales ont également été filtrées par la méthode OSC (Orthogonal Signal Correction) permettant de supprimer la variabilité (expérimentale, instrumentale, physiologique, etc.) contenue dans les données spectrales (matrice X) et non corrélée à l'exposition. Initialement développée en spectroscopie proche infra-rouge (Wold *et al.* 1998), le filtrage OSC a été utilisé pour prétraiter des données spectrales issues de RMN du proton (Domange *et al.* 2008 ; Gavaghan *et al.* 2002 ; Gu *et al.* 2009 ; Martin *et al.* 2009).

Les données ont ensuite été standardisées (standardisation centrée réduite, unité (les valeurs sont divisées par l'écart-type), ou pareto (les valeurs sont divisées par la racine carrée de l'écart-type)), afin de donner le même poids à toutes les variables, quelle que soit leur variance.

Identification des métabolites

Les métabolites ont été identifiés à partir d'un retour aux spectres, de la consultation de bases de données en ligne sur internet (BMRB, HMDB, KeggPathway), et de l'analyse bibliographique. De la RMN bidimensionnelle (homonucléaire ^{1}H-^{1}HCOSY et hétéronucléaire ^{1}H-^{13}CHSQC) a également été réalisée par Cécile Canlet pour la confirmation d'identification de métabolites en cas de doute (comparaison des spectres 1D et 2D à des spectres de référence disponibles dans la base de données du laboratoire à l'INRA).

Analyse statistique

Analyses multivariées : L'ACP a été utilisée pour identifier des séparations entre les groupes d'exposition, et pour mettre en évidence d'éventuels individus très différents des autres (« outliers »). Ensuite, des modélisations PLS-DA ont été effectuées sur les données brutes

ou filtrées. Nous avons choisi la régression PLS-DA qui est largement utilisée pour modéliser les observations en fonction de groupes d'exposition (Gu *et al.* 2011 ; Holmes *et al.* 2008 ; Kim *et al.* 2010 ; Sun *et al.* 2010 ; Um *et al.* 2009 ; Zira *et al.* 2010). Il s'agit d'une méthode multivariée de réduction de la dimensionnalité où un petit nombre de variables latentes (combinaisons linéaires des variables initiales qui sont représentées par les buckets) sont construites en maximisant la co-variance entre les variables X et la variable Y à expliquer (le groupe d'exposition). Ce sont ces variables latentes qui sont ensuite utilisées comme variables explicatives dans un modèle de régression linéaire, dont la variable réponse est le groupe d'exposition. Le nombre de combinaisons linéaires à inclure dans le modèle est déterminé par une validation croisée. La qualité du modèle construit est évaluée à l'aide du R2 (proportion de la variance expliquée par le modèle) et du Q2 (capacité prédictive du modèle évaluée par une validation croisée où l'échantillon d'apprentissage représente 6/7ème de l'échantillon total). La validité du modèle est également testée avec un test de permutation (n = 200).

L'importance de chaque variable dans les modèles construits a été définie à partir du « VIP » (Variable Importance in the Projection). Son calcul est basé sur la corrélation entre la variable « exposition » et toutes les composantes latentes retenues dans le modèle final et sur la contribution des variables X (buckets) dans la construction des composantes. Les variables importantes ont, en valeur absolue, une covariance et une corrélation élevées. Nous avons retenu les variables ayant un VIP supérieur à 1 ou à 2 en fonction des modélisations.

<u>Mise en évidence de différences significatives entre les groupes</u> : Un test non paramétrique de Kruskal-Wallis (seuil de significativité de 5 %) a été utilisé pour déterminer si on avait bien une différence significative entre au moins deux groupes pour les variables importantes identifiées par le modèle de PLS-DA (test global puis comparaison groupe à groupe si nécessaire). Le logiciel R (version 2.12.1) a été utilisé.

ANNEXE 2 : Comparaison des caractéristiques maternelles de l'échantillon par rapport à la cohorte

L'échantillon de 338 femmes a été comparé aux femmes de la cohorte incluses en 2004 et qui ne présentaient pas d'issue de grossesse défavorable.

	Echantillon (n=338)	Cohorte (n=1042)	p-value (chi 2)
Département de résidence	n (%)	n (%)	
Ille et Vilaine (35)	168 (49,70%)	551 (52,88%)	
Côtes d'Armor (22)	163 (48,20%)	402 (38,58%)	
Finistère ou autre (29)	7 (2,10%)	89 (8,54%)	<0,0001
Zone d'habitation			
Commune < 20 000 habitants	289 (85,50%)	853 (81,86%)	
Commune > 20 000 habitants	49 (14,50%)	184 (17,66%)	0,17
Age maternel			
< 25 ans	31 (9,20%)	113 (10,84%)	
25 – 29 ans	141 (41,70%)	406 (38,96%)	
30 – 34 ans	116 (34,30%)	363 (34,84%)	
> 35 ans	50 (14,80%)	160 (15,35%)	0,74
Indice de masse corporel (IMC) médian	22,8	21,63	
Niveau d'études			
Inférieur au baccalauréat	59 (17,5 %)	191 (18,33%)	
Baccalauréat	76 (22,5 %)	215 (20,63%)	
Etudes supérieures	202 (59,8 %)	631 (60,56%)	0,76
Statut tabagique à l'inclusion			
Non fumeuse ou ex-fumeuse	241 (71,30%)	746 (71,59%)	
Ayant arrêté au moment de la conception	43 (12,70%)	136 (13,05%)	
Fumeuse	52 (15,40%)	149 (14,30%)	0,89
Consommation d'alcool à l'inclusion			
Pas d'alcool pendant la grossesse	284 (84%)	885 (84,93%)	
Occasionnellement	47 (14%)	132 (12,67%)	
Au moins 1 verre/ jour	6 (1,80%)	11 (1,06%)	0,52

ANNEXE 3 : Pesticides utilisés en Bretagne entre 2001 et 2004 et pour lesquels des estimations ont été réalisées par le cadastre des émissions d'Air Breizh en 2003

Nom	Famille chimique	Propriétés	Cultures	Proportion des quantités reçues (en kg) sur les surfaces des communes (35 et 22)
Acétochlore	Chloroacétanilide	Herbicide	céréales	56,86%
Chlorméquat	ammonium quat	R. croissance*	céréales colza	8,18%
Carbofuran	carbamate	Insecticide	céréales	5,29%
Ethéphon	dérivé acide phosphonique	R. croissance*	céréales	5,29%
Fenpropimorphe	morpholine	Fongicide	céréales	3,52%
Imidaclopride	nitroguanidine	Insecticide	céréales	3,01%
Glyphosate	aminophosphonate	Herbicide	toutes cultures	2,78%
Bromoxynil	hydroxybenzonitrile	Herbicide	céréales	2,77%
Diméthachlore	chloroacétanilide	Herbicide	colza	2,43%
Isoproturon	urée substituée	Herbicide	céréales	2,01%
S-métolachlore	chloroacétanilide	Herbicide	céréales	1,28%
Prochloraz	imidazole	Fongicide	céréales	1,16%
Procymidone	dicarboximide	Fongicide	colza	1,11%
Cyprodinil	anilinopyrimidines	Fongicide	céréales	1,02%
Clomazone (dimethazone)	oxazolidine	Herbicide	colza	0,87%
Epoxyconazole	triazole	Fongicide	céréales	0,52%
Chlorothalonil	chloronitrile	Fongicide	Légumes céréales	0,44%
Pyrimicarbe	carbamate	Insecticide	céréales colza	0,29%
Pendiméthaline	dinitroaniline	Herbicide	céréales	0,20%
Benfuracarbe	carbamate	Insecticide	céréales	0,17%
Tébuconazole	triazole	Fongicide	céréales colza	0,14%
Ioxynil	hydroxybenzonitrile	Herbicide	céréales	0,10%
Carbosulfan	carbamate	Insecticide	céréales	0,10%
Diflufénicanil	carboxamide	Herbicide	céréales	0,10%
Anthraquinone	quinone	Fongicide	céréales	0,09%
Trifluraline	dinitroaniline	Herbicide	Légumes colza	0,08%
Krésoxim-méthyl	strobilurine	Fongicide	céréales	0,07%
Linuron	urée substituée	Herbicide	Légumes	0,06%
Mépiquat-chlorure	Ammonium quaternaire	R. croissance*	céréales	0,04%
Deltaméthrine	pyréthrinoïde	Insecticide	céréales colza	0,02%
Métconazole	triazole	Fongicide	céréales colza	0,01%
Carbendazime	carbamate	Fongicide	Légumes céréales	0,00%
lambda-cyhalothrine	pyréthrinoïde	Insecticide	céréales colza	0,00%
Difénoconazole	triazole	Fongicide	céréales	0,00%

ANNEXE 4 : Valorisation

Communications orales

Congrès internationaux :

Bonvallot N, Tremblay-Franco M, Canlet C, Chevrier C, Warembourg C, Cravedi JP, Cordier S. **Metabolomics tools for identifying biomarkers of complex pesticide exposure in urine of pregnant women in Brittany, France**. *24th Annual Conference for the International Society for Environmental Epidemiology*. 26-30 August 2012, Columbia, South-Carolina, United States.

Congrès nationaux

Cravedi J-P, **Bonvallot N**, Canlet C, Tremblay-Franco M, Blas y Estrada F, Gautier R, Cordier S. **Les expositions orales à un mélange de faibles doses de pesticides représentatif des usages bretons altère le métabolisme de rates gestantes exposées et de leur fœtus**. *44ème congrès du Groupe Français des Pesticides*, 26-29 mai 2014, Schoelcher, Martinique, France.

Bonvallot N, Tremblay-Franco M, Chevrier C, Canlet C, Warembourg C, Cordier S, Cravedi J-P. **Metabolomics to study multiple exposure to pesticides in pregnant women: association of epidemiology and toxicology**. *Rencontres Scientifiques du Réseau doctoral en Santé Publique*. 8-10 avril 2014, Paris, France.

Bonvallot N, Tremblay M, Canlet C, Chevrier C, Cravedi JP, Cordier S. 2012. **Application de la métabolomique pour l'identification de biomarqueurs d'exposition complexe aux pesticides chez la femme enceinte.** *Colloque National du Réseau Antiopes*. 19-20 mars 2012, Avignon, France.

Webinaires

Bonvallot N. **Pesticides, données récentes sur les expositions et les risques dans un contexte français**. Réseau d'échange sur les enjeux en santé environnementale. Webinaire

organisé par Santé Canada, Institut national de santé publique du Québec et Université de Montréal. 18 mars 2014.

Communications affichées

Bonvallot N, Canlet C, Blas-Y-Estrada F, Gauthier R, Tremblay-Franco M, Cordier S, Cravedi J-P. **A low-dose of a complex pesticide mixture disrupts the metabolome of pregnant rats and their offspring**. Communication submitted to the *50th congress of the European Societies of Toxicology. Eurotox.* 7-10 September 2014, Edinburgh, Scottland, United Kingdom.

Bonvallot N, Tremblay-Franco M, Canlet C, Chevrier C, Cordier S, Cravedi JP. **Identification of biomarkers of pesticides exposure in pregnant women: a new approach associating human and animal studies with metabolomic tools**. *4th Health Food Symposium, SAS 2012*. 18-19 July 2012, Toulouse, France.

METABOLOMICS TOOLS FOR IDENTIFYING BIOMARKERS OF COMPLEX PESTICIDE EXPOSURE IN URINE OF PREGNANT WOMEN IN BRITTANY

BONVALLOT NATHALIE[1,2,3], TREMBLAY-FRANCO MARIE[3], CANLET CECILE[3], CHEVRIER CECILE[2], CRAVEDI JEAN-PIERRE[3], CORDIER SYLVAINE[2]

[1] EHESP – School of public health, Rennes – Sorbonne Paris Cité, France
[2] INSERM UMR 1085 IRSET – Institut de recherche en santé, environnement, travail, Rennes, France
[3] INRA UMR 1331 Toxalim – French national institute for agricultural research, Toulouse, France

Corresponding author : Nathalie Bonvallot, Avenue du Professeur Léon Bernard, CS74312, 35043 Rennes Cedex, France. Tel: +332 99 02 26 22. E-mail: nathalie.bonvallot@ehesp.fr

Topics: 1-omics, 2-pesticides, 3-early programming
Key-words: metabolomics, pesticides, environmental exposure, biomarkers, early programming

Background: The use of pesticides and the related environmental contaminations can lead to human exposure to various molecules. In early-life, such exposures could be responsible for developmental effects. However, human health risks associated with exposure to complex mixtures are currently unexplored.

Objective: This project aims at answering the following questions: What is the influence of exposures to multiple pesticides on the metabolome? What mechanistic pathways could be involved in the metabolic changes?

Methods: Based on the PELAGIE cohort (Brittany, France), 338 pregnant women were classified in 3 groups according to the surface of land dedicated to agricultural cereal activities in their town of residence. Nuclear magnetic resonance-based metabolomics analyses were performed on urine samples collected in early pregnancy. Partial least squares regression-discriminant analysis was used to discriminate the 3 groups of women based on the metabolomic urinary data.

Results: We found a high inter-individual variability, mainly due to the differences in the gestational age. After restriction of our sample to pregnant women in their 11st week of pregnancy (N=83), the 3 groups were correctly discriminated (R2=90.7% and Q2=0.53). The most statistically significant changes were observed for citrate and hippurate, with a decreasing trend, and glycine and lactate with an increasing trend.

Conclusion: This work shows that metabolic footprinting could be a valuable tool for the classification of individuals according to their exposure to complex pesticide mixtures. The identification of discriminating metabolites suggests that this exposure could induce an oxidative stress and perturbations of energy metabolism.

Les expositions orales à un mélange de faibles doses de pesticides représentatif des usages bretons altère le métabolisme de rates gestantes exposées et de leur fœtus

Cravedi Jean-Pierre (1), Bonvallot Nathalie (1)(2)(3), Canlet Cécile (1), Tremblay-Franco Marie (1),

Blas y Estrada Florence (1), Gautier Roselyne (1), Cordier Sylvaine (2)(4).

(1) *INRA UMR 1331 Toxalim. 186 chemin de Tournefeuille – jcravedi@toulouse.inra.fr*

(2) *INSERM UMR1085 IRSET. Avenue du Pr. Léon Bernard, CS74312, 35043 Rennes cedex*

(3) *EHESP Rennes, Sorbonne Paris Cité. Avenue du Pr. Léon Bernard, CS74312, 35043 Rennes cedex*

(4) *Université de Rennes 1. Avenue du Général Leclerc. 35042 Rennes cedex.*

Résumé

L'utilisation des pesticides engendre des expositions de l'Homme à de nombreux résidus (substances mères ou métabolites). Pendant la période prénatale, ces expositions pourraient être responsables d'effets trans-générationnels se déclarant plus tard au cours de la vie adulte. Cette étude a pour objectif d'évaluer les modifications métaboliques chez la rate gestante exposée à un mélange de faibles doses de pesticides représentatif des usages dans la région Bretagne (France), et de voir si des modifications peuvent être mises en évidence chez les fœtus en fin de gestation en lien avec l'exposition.

Dix rates gestantes Wistar ont été exposées, par la voie de l'aliment, à un mélange de faibles doses de 8 pesticides représentant les principaux usages sur grandes cultures en Bretagne en 2004 : acétochlore (246 µg/kg/j), bromoxynil (12 µg/kg/j), carbofuran (22,5 µg/kg/j), chlorméquat (35 µg/kg/j), éthéphon (22,5 µg/kg/j), fenpropimorphe (15,5 µg/kg/j), glyphosate(12 µg/kg/j) et imidaclopride (12,5 µg/kg/j). La dose totale ingérée (378 µg/kg/j) a été choisie comme étant la somme des DJA de chacun des pesticides ; chaque exposition à chaque pesticide ayant ensuite été estimée relativement à la proportion d'usage breton, ce qui donne une plus grande contribution à l'acétochlore et au carbofuran. Un lot de dix rates témoin ont reçu un aliment sans pesticides. Les femelles ont été nourries *ad libitum* du début de la gestation (4ème jour) jusqu'au 21ème jour. Les urines de 24 heures ont été collectées au 15ème jour de la gestation (fin de l'organogénèse). Au 21ème jour, les mères ont été euthanasiées et les fœtus prélevés. Le sang, le foie (lobe droit pour les mères, foie entier pour les fœtus) et le cerveau ont été recueillis en vue d'une analyse RMN du proton. Des analyses en composantes principales (ACP) et des régressions PLS-DA (partial least square – discriminant analysis) ont été réalisée pour discriminer le groupe contrôle du groupe exposé. Les métabolites modifiés ont ensuite été identifiés à partir d'un test de Kruskal-Wallis (seuil de significativité de 0,05) et une recherche dans les bases de données et la littérature.

Chez les mères, l'analyse métabolomique a révélé un grand nombre de métabolites modifiés ente les groupes, essentiellement au niveau hépatique et cérébral. Les métabolites impliqués (lipides, acéto-acétate, 3-hydroxybutyrate, ATP, ADP/AMP, alanine, glutamate, aspartate, N-acétylaspartate,

succinate et autres acides aminés, glucose, glycogène, glycérol, taurine et glycérophosphocholine) suggèrent un stress oxydant associé à un dysfonctionnement mitochondrial et une altération du métabolisme du glucose. Des observations similaires ont été faites pour le métabolisme énergétique et le métabolisme du glucose au niveau du foie des fœtus, et un stress oxydant a également pu être suggéré au niveau du cerveau des fœtus.

Ce travail suggère que les expositions maternelles à de faibles doses de pesticides représentant les usages bretons en 2004 pourraient être responsables d'une réponse métabolique visible non seulement chez les mères, mais également chez les fœtus prêts à naître. L'impact de ces modifications à plus long terme doit être étudié.

Mots-clés : Métabolomique, biomarqueurs, pesticides, développement

METABOLOMICS TO STUDY MULTIPLE EXPOSURE TO PESTICIDES IN PREGNANT WOMEN: ASSOCIATION OF EPIDEMIOLOGY AND TOXICOLOGY

Nathalie Bonvallot[1,2,3], Marie Tremblay-Franco[3], Cécile Chevrier[1,4], Cécile Canlet[3], Sylvaine Cordier[1,4], Jean-Pierre Cravedi[3]

[1] INSERM UMR 1085 IRSET, Rennes, FRANCE.

[2] EHESP-School of Public health, Rennes, FRANCE.

[3] INRA UMR 1331 Toxalim; University of Toulouse, INP, ENVT, EIP, UPS, Toulouse, FRANCE.

[4] University of Rennes I, Rennes, FRANCE.

Introduction: The use of pesticides generates exposure of human beings to numerous molecules. In early-life, such exposures may be responsible of adverse effects in later life. However, hazards for human health associated with the exposure to complex mixtures are very difficult to assess. This project aims at answering the following questions: What is the influence of exposures to mixtures of pesticides on the metabolome? what mechanistic pathways could be involved in the observed metabolic changes?

Methods: The study combines epidemiological and toxicological approaches to take advantages of the benefits of both approach (actual exposures based on human data and low inter-individual variability in toxicology). The epidemiological study is based on a subset of the PELAGIE cohort (Brittany, France): 83 pregnant women were classified in 3 groups according to the surface of land dedicated to cereal crops in their town of residence. Urine samples were collected at an early stage of pregnancy, and cord-blood samples at birth. In the experimental approach, 10 pregnant rats were exposed to a pesticide mixture – representative of the exposure of women from the PELAGIE cohort – by oral route from early pregnancy to parturition and were compared to 10 non exposed rats (controls). Urine (gestational day (GD) 15), blood, liver and brain samples (GD20) were collected. For all samples, nuclear magnetic resonance-based metabolomics analyses were performed. PCA and PLS-DA were used to discriminate the metabolic profile from biological samples of the different exposure groups. Polytomous regressions were added to adjust for potential confounders in the epidemiological study.

Results: Urinary and blood metabolic profiles from the 3 human groups of exposure were correctly separated with a PLS-DA model After adjusting for maternal age, parity, body mass index and smoking habits, the most statistically significant changes in urine in early gestation were observed for glycine, threonine, lactate and glycerophosphocholine (upward trend), and for citrate (downward trend). In cord-blood, changes involved acetate, citrate, dimethylamine,

creatinine, amino acids (downward trend) and aceto-acetate (upward trend). In animals, the metabolomics analysis reveals a large number of modified metabolites between groups, both in dams and pups, especially in the blood, liver and brain (lipids, aceto-acetate, 3-hydroxybutyrate, ATP, ADP/AMP, alanine, glutamate, aspartate, N-acetylaspartate, succinate and other amino-acids, glucose, glycogen, glycerol, taurine, and glycerophosphocholine).

Discussion - conclusion: The metabolic modifications suggest an osmo-protective mechanism associated with an oxidative stress. Animal data confirmed this hypothesis with metabolic changes suggesting a mitochondrial dysfunction and an impairment of the glucose and energetic metabolism. The impact of these modifications later in life should be studied.

Keywords : *Pesticides, Metabolomics, Mixtures, Environmental health, Exposures, Development.*

APPLICATION DE LA METABOLOMIQUE POUR L'IDENTIFICATION DE BIOMARQUEURS D'EXPOSITION COMPLEXE AUX PESTICIDES CHEZ LA FEMME ENCEINTE

BONVALLOT NATHALIE[1,2,3], TREMBLAY-FRANCO MARIE[3], CANLET CECILE[3], CHEVRIER CECILE[2], CRAVEDI JEAN-PIERRE[3], CORDIER SYLVAINE[2]

[1] EHESP – School of public health, Rennes – Sorbonne Paris Cité, France
[2] INSERM UMR 1085 IRSET – Institut de recherche en santé, environnement, travail, Rennes, France
[3] INRA UMR 1331 Toxalim – French national institute for agricultural research, Toulouse, France

Contexte : L'utilisation de pesticides et les contaminations environnementales conséquentes peuvent conduire à des expositions de l'homme à de multiples molécules. Lors de périodes de vulnérabilité accrues (vie foetale ou périnatale), ces expositions pourraient être responsables d'effets transgénérationnels. Pourtant aujourd'hui, aucune stratégie d'évaluation des mélanges ne permet de caractériser les risques sanitaires liée à l'exposition de l'homme à des mélanges complexes.

Objectif : Le projet vise à répondre aux questions suivantes : Quelle est l'influence d'expositions à de multiples pesticides sur le métabolome ? Quels sont les voies mécanistiques principales à l'origine des modifications métaboliques observées ?

Méthodes : Un échantillon de 338 femmes enceintes issu de la cohorte épidémiologique Pélagie (Bretagne) a été retenu. Ces femmes ont été classées en 3 groupes en fonction de la superficie dédiée aux activités agricoles céréalières dans leur commune de résidence. Des analyses métabolomiques par RMN ont été effectuées sur des échantillons urinaires recueillis en début de grossesse. La régression PLS-DA a été utilisée pour modéliser les observations en fonction des groupes de femmes.

Résultats : Les groupes d'« exposition aux céréales » sont discriminés par un modèle comprenant 5 composantes principales et expliquant 88,7 % de la variabilité (Q2=0.5). Des modifications entre groupes se sont révélées statistiquement significatives pour la glycine, les acides citrique, hippurique et lactique. La concentration urinaire de ces métabolites tend à diminuer en fonction de l'exposition, mais cette tendance n'est pas évidente du fait de la grande variabilité interindividuelle de l'espèce

humaine. Une expérimentation animale reproduisant les expositions complexes des femmes sera conduite pour confirmer ces premiers résultats.

Discussion : Ces observations tendent à montrer qu'une exposition complexe aux pesticides pourrait entrainer une déplétion en glycine, acide aminé utile à la conjugaison des xénobiotiques et avoir un impact sur la production énergétique. Il est aussi possible que les modifications d'acide hippurique soient liées à l'ingestion de plats préparés (riches en benzoates), qui pourrait être plus élevée chez les femmes résidant en milieu urbain.

RENSEIGNEMENTS
reese@gris.umontreal.ca

Mardi, 11 septembre 2012

Webinaire du 18 mars 2014 organisé par le

Réseau d'échanges sur les enjeux en santé environnementale (RÉESE)

Pesticides, données récentes sur les expositions et les risques pour la santé dans un contexte français

Nathalie Bonvallot, enseignant chercheur à l'École des Hautes Études en Santé Publique, Institut de recherche en santé environnement et travail, Rennes
Courriel : nathalie.bonvallot@ehesp.fr

Objectif d'apprentissages

- Connaître le contexte français lié à l'usage des pesticides;
- Connaître les études mise en œuvre en vue d'évaluer les expositions environnementales, incluant l'alimentation;
- Mise à jour des données scientifiques sur les effets sanitaires liés à l'exposition aux pesticides;
- Connaître l'intérêt potentiel des nouveaux outils « omics » pour comprendre les relations exposition/ risque.

Résumé de la présentation

La France est l'un des premiers utilisateurs mondiaux de pesticides. L'application de ces produits conduit à des contaminations des différents compartiments de l'environnement. L'impact de ces contaminations sur la santé, en particulier la santé de l'enfant, est peu connu. La question des risques liés à l'exposition aux faibles doses est donc une préoccupation de santé publique. Les recherches récentes se focalisent surtout sur les effets des pesticides organophosphorés et de certains herbicides, et suggèrent des associations respectivement avec le développement neurologique de l'enfant et la croissance fœtale. Les analyses métabolomiques réalisées en population humaine permettront de mieux comprendre l'action combinée des faibles doses des pesticides sur l'organisme et d'identifier les champs sur lesquels il est nécessaire de poursuivre la recherche en termes de risque.

Le Réseau d'échanges sur les enjeux en santé environnementale (RÉESE) est un regroupement virtuel de professionnels qui s'intéressent au domaine de la santé environnementale et qui échangent leurs savoirs, expériences et pratiques sur des thèmes et enjeux scientifiques en santé environnementale par le biais de conférences virtuelles.

Nathalie Bonvallot

Nathalie Bonvallot est pharmacien, toxicologue, enseignant chercheur à l'Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique (EHESP), et Institut de recherche sur la Santé, l'Environnement et le Travail (IRSET), Rennes, France. Après plusieurs années d'activités dans les institutions sanitaires françaises (en particulier Agence Nationale de Sécurité Sanitaire liée à l'alimentation, l'environnement et le travail), Nathalie Bonvallot enseigne la toxicologie et l'évaluation des risques sanitaires auprès des formations académiques (masters) et d'ingénieur de santé à l'EHESP. Ses travaux de recherche sont centrés sur les risques liés aux expositions aux faibles doses des composés chimiques, en particulier semi-volatils (pesticides, phtalates…), pour la femme enceinte et l'enfant, avec une approche « multi-expositions » (risques liés aux mélanges), en intégrant les nouveaux outils haut-débit comme la métabolomique.

Références de la présentation

- Aubertot J-N, Barbier J-M, Carpentier A, Gril J-N, Guichard L, Lucas, et al. 2005. Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux. Expertise scientifique collective. Rapport de l'expertise réalisée par l'INRA et le Cemagref à la demande du Ministère de l'agriculture et de la pêche (MAP) et du Ministère de l'écologie et du développement durable (MEDD).
- Institut National de la Recherche Médicale. 2013. Pesticides : effets sur la santé, une Expertise Collective de l'INSERM.
- ANSES. 2011. Etude de l'alimentation totale française 2 (EAT2). Tome 2: résidus de pesticides, additifs, acrylamide, hydrocarbures aromatiques polycycliques. 405 pages.
- ANSES, Observatoire des Résidus de Pesticides. 2010. Recommandations et perspectives pour une surveillance nationale de la contamination de l'air par les pesticides. Synthèse et recommandations du comité d'orientation et de prospective scientifique de l'observatoire des résidus de pesticides. Rapport Scientifique. 55 pages
- Institut de Veille Sanitaire. 2010. Exposition de la population française aux polluants de l'environnement. Volet environnemental de l'étude nutrition santé – premiers résultats.

A LOW-DOSE OF A COMPLEX PESTICIDE MIXTURE DISRUPTS THE METABOLOME OF PREGNANT RATS AND THEIR OFFSPRING

BONVALLOT NATHALIE[1,2,3], CANLET CECILE[3], TREMBLAY-FRANCO MARIE[3], BLAS-Y-ESTRADA FLORENCE[3], GAUTHIER ROSELYNE[3], CORDIER SYLVAINE[2], CRAVEDI JEAN-PIERRE[3].

[1] EHESP – School of public health, Rennes – Sorbonne Paris Cité, France

[2] INSERM UMR 1085 IRSET – Institut de recherche en santé, environnement, travail, Rennes, France

[3] INRA UMR 1331 Toxalim – French national institute for agricultural research, Toulouse, France

Corresponding author : Nathalie Bonvallot, Avenue du Professeur Léon Bernard, CS74312, 35043 Rennes Cedex, France. Tel: +332 99 02 26 22. E-mail: nathalie.bonvallot@ehesp.fr

Category: omics technologies

This study aims at assessing the metabolic modifications in pregnant rat and their offspring, induced by a low-dose of pesticide mixture representative of human exposures. Twenty (10 per group) pregnant rats were exposed to a low-dose mixture of 8 pesticides representing the main environmental exposure in Brittany (France) in 2004 (acetochlor, bromoxynil, carbofuran, chlormequat, etephon, fenpropimorph, glyphosate and imidacloprid). Females were fed ad libitum from early pregnancy (gestational day GD4) to GD21. Urine samples were collected at GD 15. At the end of the exposure, mothers and pups were euthanized. Blood, liver and brain samples were collected and 1H NMR-based metabolomics analyses were performed. PCA and PLS-DA were used to discriminate control and exposed groups. Significantly modified metabolites were then identified with a Kruskal-Wallis test ($p<0.05$) and matching with databases and report in literature. In dams, the metabolomics analysis reveals a large number of modified metabolites between groups, especially in the liver and brain. The involved metabolites (lipids, ketone bodies, ATP, ADP/AMP, alanine, glutamate, aspartate, N-acetylaspartate, and other amino-acids, glucose, glycogen, glycerol, taurine, and glycerophosphocholine) suggest that the pesticide mixture induces an oxidative stress associated with a mitochondrial dysfunction and an impairment of the glucose metabolism. Similar findings are observed in the liver and brain of the offspring. This work shows that a maternal exposure to low-doses of pesticides used in France is responsible of a metabolic response in offspring involving an oxidative stress, an impairment of the mitochondria, an inflammatory response and a modification of the glucose metabolism.

IDENTIFICATION OF BIOMAKERS OF PESTICIDE EXPOSURE IN PREGNANT WOMEN: A NEW APPROACH ASSOCIATING HUMAN AND ANIMAL STUDIES WITH METABOLOMIC TOOLS

N. Bonvallot[1,2,3], M. Tremblay-Franco[3], C. Canlet[3], C. Chevrier[2], J.P. Cravedi[3], S. Cordier[2]

[1] EHESP-School of Public health, Rennes, Sorbonne Paris Cité, France, [2] INSERM UMR1085 (IRSET), Rennes, France, [3] INRA UMR 1331 (Toxalim), Toulouse, France

BACKGROUND AND OBJECTIVES

The use of pesticides and related environmental pollutions can lead to the exposure of human beings to a large variety of molecules. In early-life, such exposure could be responsible of developmental effects. However, hazards for human health associated with the exposure to complex mixtures are very difficult to assess. This project aims at answering the following questions: What is the influence of exposures to mixtures of pesticides on the metabolome? What mechanistic pathways could be involved in the observed metabolic changes?

MATERIAL AND METHODS

1. Epidemiological approach

The PELAGIE cohort
Pregnant women included between 2002 and 2006 in Brittany, France
N=3322

Metabolomic faisability

Availability of urine sample in early gestation and cord blood sample at birth **N=1061**

Same duration of freezing

Women included in 2004, sample frozen since 2004 **N=338**

variability according to the gestational age of urine sample

Urine sample at the 11th week of gestation **N=86**

The proximity of agricultural activities may lead to an environmental exposure to pesticides (Gunier et al., 2011) → 3 groups according to the surface of land (%) dedicated to cereals culture in the town of residence

Group 1 <17% N=41	Group 2 17-25% N=21	Group 3 >25% N=24

Gunier R, Ward M, Airola M, Bell E, Colt J, Nishioka M, et al. 2011. EHP 119: 970-976

2. Toxicological approach

Pregnant rats Wistar exposed orally (*per os*) to a mixture of pesticides from GD5 to GD20 **N=39**

Urine samples collected in dams at GD15 (end of organogenesis) **N=32**

Blood, liver and brain samples in dams and pups (♀&♂) collected the day before birth **N=39**

Pesticide exposure was chosen to be representative of the environmental exposure of pregnant women from the Pelagie cohort, based on a total dose corresponding to the sum of the ADI of each pesticide: acetochlor, bromoxynil, carbofuran, chlormequat, etephon, fenpropimorph, glyphosate, imidacloprid (main uses in Brittany, France, in 2004 in cereals culture) + larger contributors to French dietary exposure (for group 3)

Group 0 (control) N=10	Group 1 8 pest. N=10	Group 2 8 pest. N=10	Group 3 18 pest. N=10

3. Metabolomic approach

Sample preparation (phosphate buffer, TSP and D2O)

1H NMR spectroscopy (Brucker Avance DRX-600)

Data preprocessing (Fourier transformation, spectra phased, calibrated and baseline corrected)

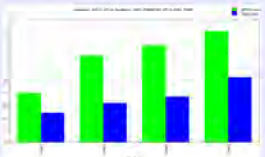
Statistical analysis: PLS-DA SIMCA P+

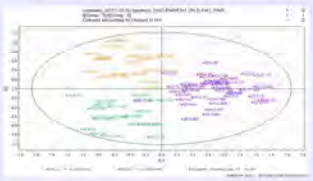
Metabolite identification

Biological interpretation

FIRST RESULTS ON HUMAN URINE SAMPLES

After the exclusion of outliers observed in a preliminary principal component analysis (N=83), and an orthogonal signal correction filtering (pareto standardization, 8 components subtracted), the 3 groups of women were correctly discriminated with a PLS-DA model containing 4 principal components (R2=90.7% and Q2=0.53, pareto standardization).



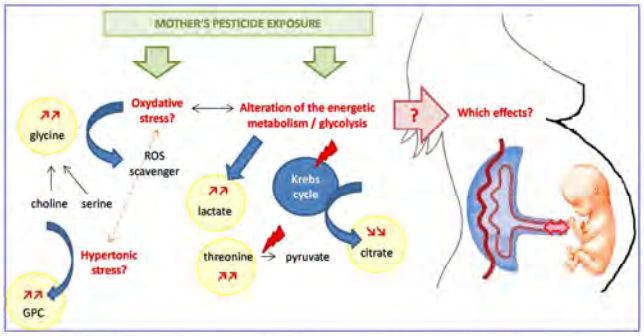


The most significant variables explaining the discrimination were citrate, hippurate (decreasing trend), and threonine, glycerophosphocholine, glycine and lactate (increasing trend). The modifications were statistically significant between the groups ($p<0.05$) excepted for hippurate.

Metabolite	Chemical shifts (ppm)	Trends
Threonine	δ 4,235	↗
Glycine	δ 3,545	↗
Glycerophosphocholine	δ 4,285	↗
Lactate	δ 4,095	↗
Citrate	δ 2,665 - 2,545 - 2,525	↘
Hippurate	δ 7,645-7,565-7,555-3,975	↘

DISCUSSION

This work shows that metabolic fingerprints could be a valuable tool for the classification of individuals according to their degree of exposure to complex pesticide mixtures. The identification of discriminating metabolites suggests an oxidative stress and some perturbations in energy metabolism. This may disturb transplacental exchanges and may have an impact on developmental outcomes.



The results obtained from the toxicological approach will allow us to confirm these hypotheses.

Financial support: EHESP, Ministère de l'Environnement/ INERIS, INRA, INSERM

ANNEXE 5 : Valorisation associée au projet

Articles

Jamin E, **Bonvallot N**, Tremblay-Franco M, Cravedi J-P, Chevrier C, Cordier S, Debrauwer L. Untargeted screening of pesticides metabolites by LC-HRMS. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2014. 406:1149-1161.

Désert R, Costet N, Cordier S, **Bonvallot N**. Impact of maternal obesity on the metabolic profile of pregnant women and their offspring at birth. En préparation.

Communications orales

Zalko D, **Bonvallot N**, Tremblay-Franco M, Soto AM, Chevrier C, Vinson F, Cravedi J.P, Sonnenschein C, Jourdan F, Gauthier R, Cordier S, Debrauwer L, Wadia P.R, Cabaton N, Canlet C. Metabolomics-based biological markers of perinatal imprinting: evidences in the field of toxicology, from studies in animal exposed to endocrine disruptors and human exposed to pesticides. The 33rd International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants and POPs. August, 25-20 2013. Daegu, Korea.

Cravedi J.P, **Bonvallot N**, Crépet A, Leblanc J.C, Graillot V, Audebert M, Jamin E, Tremblay-Franco M, Canlet C, Cordier S, Chevrier C, Payrastre L, Debrauwer L. Nouvelles approches pour appréhender l'exposition aux pesticides en mélange et leurs effets biologiques. 43ème congrès du Groupe Français des Pesticides. 29-31 Mai 2013. Albi, France.

Jamin E, Gaudicheau M, **Bonvallot N**, Tremblay-Franco M, Cravedi J-P, Cordier S, Debrauwer L. Métabolomique semi-ciblée par LC-HRMS de métabolites de pesticides dans des urines: vers une caractérisation de l'exposition humaine ? Communication orale aux 6èmes journées scientifiques du réseau RFMF. 21-23 mai 2012, Nantes, France.

Communications affichées

Debrauwer L, Jamin E, **Bonvallot N**, Tremblay-Franco M, Cordier S, Chevrier C, Cravedi J-P. How far can we trust untargeted exposomics: significance and limits of an exploratory study on urinary pesticide metabolite screening for human exposure evaluation. 29th ASMS Asilomar Conference, Pacific Grove, CA, 18-22 octobre 2013.

Jamin E, **Bonvallot N**, Tremblay-Franco M, Cravedi JP, Chevrier C, Cordier S, Debrauwer L. Untargeted screening of pesticides metabolites by LC-HRMS: a tool for human exposure evaluation? In: 19th International Mass Spectrometry Conference (IMSC 2012). 15-21 September 2012. Kyoto, Japan.

Anal Bioanal Chem (2014) 406:1149–1161
DOI 10.1007/s00216-013-7136-2

RESEARCH PAPER

Untargeted profiling of pesticide metabolites by LC–HRMS: an exposomics tool for human exposure evaluation

Emilien L. Jamin · Nathalie Bonvallot · Marie Tremblay-Franco · Jean-Pierre Cravedi · Cécile Chevrier · Sylvaine Cordier · Laurent Debrauwer

Received: 10 April 2013 / Revised: 7 June 2013 / Accepted: 10 June 2013 / Published online: 28 July 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract Human exposure to xenobiotics is usually estimated by indirect methods. Biological monitoring has emerged during the last decade to improve assessment of exposure. However, biomonitoring is still an analytical challenge, because the amounts of sample available are often very small yet analysis must be as thorough and sensitive as possible. The purpose of this work was to develop an untargeted "exposomics" approach by using ultra-high-performance liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (UHPLC–HRMS), which was applied to the characterization of pesticide metabolites in urine from pregnant women from a French epidemiological cohort. An upgradable list of pesticides commonly used on different crops, with their metabolites (more than 400 substances) was produced. Raw MS data were then processed to extract signals from these substances. Metabolites were identified by tandem mass spectrometry; putative identifications were validated by comparison with standards and metabolites generated by experiments on animals. Finally, signals of identified compounds were statistically analyzed by use of multivariate methods. This enabled discrimination of exposure groups, defined by indirect methods, on the basis of four metabolites from two fungicides (azoxystrobin, fenpropimorph) used in cereal production. This original approach applied to pesticide exposure can be extended to a variety of contaminant families for upstream evaluation of exposure from food and the environment.

Keywords Mass spectrometry · Pesticides · Exposure · Metabolites · Epidemiology

Published in the special issue *Analytical Science in France* with guest editors Christian Rolando and Philippe Garrigues.

E. L. Jamin · N. Bonvallot · M. Tremblay-Franco · J.-P. Cravedi · L. Debrauwer
INRA, UMR1331, Toxalim, Research Centre in Food Toxicology, 180 Chemin de Tournefeuille, 31027 Toulouse, France

E. L. Jamin (✉) · N. Bonvallot · M. Tremblay-Franco · J.-P. Cravedi · L. Debrauwer
Toulouse University, INP, UMR1331, Toxalim, 180 Chemin de Tournefeuille, 31027 Toulouse, France
e-mail: jamin@toulouse.inra.fr

N. Bonvallot · C. Chevrier · S. Cordier
INSERM UMR 1085 IRSET – Institut de Recherche en Santé, Environnement, Travail, Avenue du Général Leclerc, 35042 Rennes, France

N. Bonvallot
EHESP – School of Public Health, Avenue du Général Leclerc, 35042 Rennes - Sorbonne Paris Cité, France

C. Chevrier · S. Cordier
University of Rennes I, Avenue du Général Leclerc, 35042 Rennes, France

Introduction

The total amount of active pesticide ingredients used worldwide was estimated to be approximately 2.4 million tons in both 2006 and 2007 [1]. In France, the main European consumer of pesticides, total consumption of these active ingredients was estimated to be approximately 62 thousand tons in the period 2010–2011 [2]. Use of such amounts of industrial chemical pesticides raises the question about their possible effect on health, not only to workers who apply the chemicals but also to the residents of the areas in which they are used and, more broadly speaking, the general population. Pesticides can have adverse health effects on humans, including endocrine and neurological disorders [3–6], reproductive and developmental toxicity [7–10], and cancers [11–14]. However, assessment of human exposure to pesticides still limits of the quality of the evidence that observational studies can provide and the risk-assessment process. More refined techniques are needed to provide solid evidence of exposure.

In the general population, levels of exposure to pesticides in the diet are usually estimated by combining analysis of the shopping basket with data on the concentration of pesticides in food (obtained via monitoring programs). However, for most consumers sources of exposure to pesticides are not restricted to contaminated food or drink only. The population may come into contact with pesticides as a result of their occupation, domestic use, or by being in proximity to rural areas where pesticides are applied. A complete appraisal of exposure of the general population to different sources of pesticide residues in France was published by the French Agency for Food, Environmental, and Occupational Health and Safety (ANSES) in 2010 [15]. Because of the different routes by which exposure may occur, measurement of the parent compound and/or its metabolites in an accessible biological sample, for example urine, is the method of choice for evaluation of total exposure [16]. During the last decade, biological monitoring in general [17], and of pesticides in particular, has been developed on the basis of analysis of blood (or serum, or plasma), milk, saliva, and urine [18–22]. Among these samples, urine has frequently been used for the determination of pesticides because it is collected non-invasively and generally contains non-persistent pesticides or their corresponding metabolites in higher concentrations than in other biological samples [23–25]. In addition, monitoring of pesticide metabolites in urine has been shown to be appropriate for farm workers [25]. Nevertheless, most published data obtained from analysis of urine specimens have dealt with organophosphorus, carbamate, or pyrethroid insecticides and triazine and chloroacetamide herbicides [15, 26].

Several analytical approaches are available for multi-residue analysis. Methods for biomonitoring of pesticides have recently been reviewed [27–29]; more recently, methods for the screening of veterinary drugs have also been reviewed [30]. Such methods can be split into two main strategies: targeted or untargeted analysis. The most sensitive way to detect a compound is to design the most specific analytical method possible, from sample preparation to detection. This targeted approach is well adapted to the biomonitoring of known and hazardous compounds, for which accurate measurements of biological concentrations are required, to place results in e.g. a public health risk context. In this way, exposure to chlorpyrifos has been characterized by monitoring specific metabolites by use of mass spectrometry [31], exposure to permethrin by enzyme-linked immunosorbent assay [32], or exposure to imidacloprid by fluorescence polarization immunoassay [33]. The targeted approach could be extended, by use of mass spectrometry, to monitoring of several members of the same class of contaminants, for example pesticides [34]. Mass spectrometry coupled to liquid chromatography has become the method of choice for screening and quantification of molecules and their metabolites in biological matrices [35], particularly use of triple-quadrupole mass spectrometers operating in multiple reaction monitoring mode (MRM). Similarly, information-dependent acquisition (IDA) enables screening for up to 700 compounds by use of Q-trap-type instruments [36]. Survey scans are conducted by MRM for the 700 compounds, which trigger a product ion scan as dependant scan. Compound identification is achieved by use of library search on product-ion spectra.

Nevertheless, these targeted approaches can be applied only to known compounds for which standard compounds are available to enable setup of the decomposition reactions to be monitored by triple-quadrupole mass spectrometry. In 2008 the database of known pharmacologically and toxicologically relevant compounds (PTRC) included approximately 50,500 compounds [37]. Although this database is extensive, it is still not exhaustive (in particular for emerging contaminants, novel metabolites, or illegal substances), and only few reference compounds are commercially available. To meet the challenge of multi-exposure to complex contaminant mixtures, alternative untargeted or semi-targeted analytical approaches are required. When dealing with urine, these approaches must ensure detection of, mostly, polar metabolites, and electrospray ionization is usually the method of choice for ionization. To achieve detection of the maximum number of compounds with a variety of physicochemical properties, use of both positive and negative ionization modes is also usually required. Replacing MRM survey scans of the targeted approach by a full scan performed by high-resolution mass spectrometry (HRMS) is a promising alternative enabling detection of substances whose number is limited only by the size of the database used [38–40]. The method is simple to set up and raw HRMS data are generated independently of the list of compounds screened, which enables retrospective study of the data without the need to re-analyze samples. For these reasons, although less sensitive than MRM mode, use of high-resolution mass spectrometry with time of flight (TOF) or Orbitrap mass analyzers for screening and biomonitoring applications [41] is becoming more popular.

In this context, this work was performed to develop an analytical method enabling linking of (possibly unknown) end-products of pesticide metabolism with exposure to complex contaminant groups, for example pesticides, which could be used for screening and biomonitoring. The "exposomics" procedure proposed herein combines an untargeted analytical approach using HRMS with an "omics" type of data mining and in vivo generation of metabolites for structure confirmation. As a first step, urine samples were analyzed by high-resolution mass spectrometry combined with ultra-high-performance liquid chromatography to generate a dataset which can be queried retrospectively. Post-analysis raw data mining was then conducted to extract signals fitting a list of metabolites of interest. These

signals were then analyzed by multivariate statistical methods. For differently exposed populations the statistical model generated from identified compounds enabled discovery of metabolites (and therefore pesticides) enabling discrimination of the samples. This approach was developed and applied as proof of concept to study environmental exposure to pesticides and was based on the analysis of urine samples from pregnant women from the PELAGIE cohort recruited in an agricultural region of Brittany in France.

Materials and methods

Chemicals

Methanol and acetic acid were analytical grade and were purchased from Scharlau (Barcelona, Spain). Ultrapure water from a Milli-Q system (Millipore, Saint Quentin en Yvelines, France) was used for mobile phases. All standard pesticides (fenitrothion, fenpropimorph, azoxystrobin, procymidone, quizalofop-*p*-ethyl, chlorpropham, carbofuran, ethephon, trifluralin, dichlorvos, malathion, and cymoxanil) were purchased from Sigma–Aldrich Chemie (Saint-Quentin Fallavier, France) and were Pestanal grade.

Population and biological samples

Samples were obtained from members of the PELAGIE cohort of 3,421 women in early pregnancy from Brittany (France) enrolled, by gynecologists, from the general population between 2002 and 2006. The objective of the PELAGIE study is to assess the consequences of environmental exposure (solvents, persistent organic pollutants, pesticides …) on pregnancy, birth outcome, and infant development. This cohort is described in detail elsewhere [42]. Each woman in the cohort had to collect the first urine sample of the morning, transfer this to vials containing nitric acid to avoid bacterial degradation, and mail the samples to the study laboratory in a pre-stamped package at ambient temperature, with routine delivery taking, on average, from 1 to 3 days. On receipt, the 10-mL samples were stored at −20 °C until analysis. They were available for 95 % of the cohort. At the same time, data on social and demographic features, diet, and lifestyle were retrieved by questionnaire.

This exploratory study was restricted to women with an available urinary sample collected in 2004, to achieve similar likelihood of pesticide exposure on the basis of agricultural use and to avoid potential variability as a result of storage of biological samples for different times. Ten samples were randomly selected from among urban participants (>200,000 inhabitants), and ten samples from within each of three other groups discriminated by land surface (%) devoted to cereals crops in the municipality of residence. Thus, four groups of 10 samples were available for this study. The proportion of land devoted to cereal crops within each municipality was estimated from the French National Agricultural Census [43]. Exposure groups were defined as "urban", "weak exposure" (less than 17 % of land devoted to cultivation of cereals), "medium exposure" (between 17 and 25 % of land devoted to cultivation of cereals), and "high exposure" (more than 25 % of land devoted to cultivation of cereals).

Animal experiment

To corroborate identification of detected metabolites, a mixture of 200 μg of each of the seven pesticides (fenitrothion, fenpropimorph, azoxystrobin, procymidone, quizalofop-*p*-ethyl, chlorpropham, and carbofuran) dissolved in corn oil was administered by gavage to a female Wistar rat (Charles River) weighing 250 g. Immediately after treatment, the animal was placed in a metabolic cage and allowed ad libitum access to water and to a standard commercial diet (SAFE, Augy, France). Urine was collected 24, 48, and 72 h after exposure and stored at −20 °C until analysis. Finally, urine samples were analyzed under the same conditions as for human urine samples.

Liquid chromatography–mass spectrometry

Analysis was by ultra-high-performance liquid chromatography combined with high-resolution mass spectrometry (UHPLC–HRMS). UHPLC was performed with a RSLC3000 (Dionex–Thermo Scientific, Les Ulis, France). The chromatographic pump was operated at a flow rate of 0.25 mL min^{-1}. The mobile phase was a gradient prepared from 95:5:0.1 (*v*/*v*) H_2O–CH_3OH–CH_3CO_2H (component A) and 100:0.1 (*v*/*v*) CH_3OH–CH_3CO_2H (component B). The gradient program was: 0 min, 0 % B; from 15 to 20 min, 100 % B, from 21 to 31 min, 0 % B. Chromatographic separation was achieved on a Hypersil Gold C_{18} column (100 mm × 2.1 mm, 1.9-μm particles) (Thermo Scientific, Les Ulis, France) maintained at 35 °C.

Urine samples were diluted with an equal volume of mobile phase component A before analysis. The injection volume was 5 μL. Eluted compounds were detected by use of an LTQ-Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Scientific) equipped with an electrospray ionization source. Ionization settings used in negative mode were: spray potential −3 kV, sheath gas (N_2) flow rate 35 arbitrary units (au), auxiliary gas (N_2) flow rate 0 au, and capillary temperature 320 °C. In positive ionization mode the settings were: spray potential 3.6 kV, sheath gas flow rate 53 au, auxiliary gas flow rate 27 au, and capillary temperature 320 °C. High-resolution mass spectra were acquired at a resolution of

30,000 from *m*/*z* 60 to 800. Identification was performed by tandem mass spectrometry (MS^n) using the ion-trap mass analyzer of the LTQ-Orbitrap mass spectrometer.

Data processing and statistical treatment

Signals corresponding to ions of potential pesticides and their metabolites were extracted from raw data by use of MetWorks 1.3 (Thermo Scientific), on the basis of the HRMS signal of the exact mass of each $[M + H]^+$ or $[M - H]^-$ ion, in accordance with a mass measurement error of ±5 ppm. After their detection, structural characterization of potential metabolites was achieved by processing MS^n spectra with Xcalibur QualBrowser (Thermo Scientific). UHPLC–HRMS signals of identified metabolites were also measured with Xcalibur QuanBrowser, on the basis of chromatographic peak area normalized to the signal from an internal standard. Normalized signals were then analyzed by multivariate methods using SIMCA-P software (V12; Umetrics, Umea, Sweden). Principal-components analysis (PCA) was first used to detect intrinsic clusters or outliers. Partial least squares–discriminant analysis (PLS–DA) was then used to model the relationship between exposure conditions ("urban", "weak exposure", "medium exposure", and "high exposure") and UHPLC–HRMS data. PLS–DA is a supervised method which maximizes separation between groups. Data were preprocessed by use of orthogonal signal correction (OSC), with exposure as a correction factor. OSC filtering [44] was used to remove confounding variation (variation not linked to, e.g., physiological, experimental, or instrumental variation). Proportion of explained variance ($R2$) and predictive ability (Q^2) were used to assess the robustness of PLS-DA models. Cross-validation (sevenfold) was used to determine the number of latent variables to include in the PLS-DA model and to calculate the Q^2 value. A permutation test (200 iterations) was used to evaluate the validity of models. The variable importance in the projection (VIP), a global measure of the importance of each metabolite in the PLS-DA model, and the Kruskal–Wallis test (threshold of significance=0.05), a non-parametric version of analysis of variance, were finally used to confirm the source of metabolites.

Results and discussion

Set-up of the untargeted data-acquisition method

The procedure used in the "exposomics" approach developed in this work is shown schematically in Fig. 1. First, samples were analyzed by use of an untargeted mass spectrometric technique. In a second step, a list of compounds to be sought was edited, and screening of raw data for these was performed on the basis of exact mass matching. Detected compounds were then identified by MS–MS and/or MS^n experiments, and the corresponding chromatographic peaks (which are representative of their concentration) were integrated. These resulting data were statistically analyzed to classify samples in accordance with collected exposure data. If necessary, the list of monitored compounds can be upgraded, and the "exposomics" procedure can be performed again, without the need for re-injection of samples.

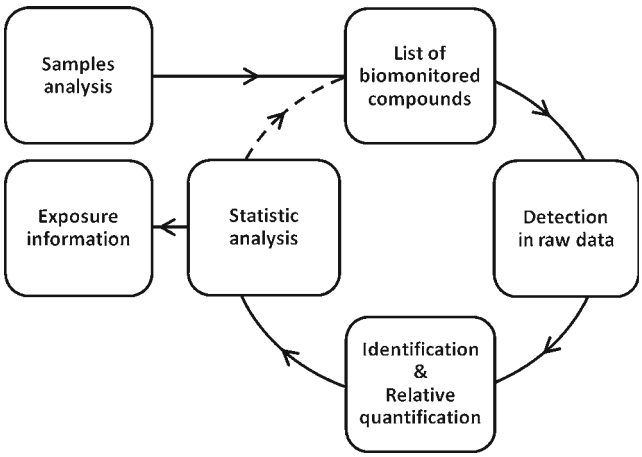


Fig. 1 The "exposomics" procedure

For untargeted data acquisition, a typical metabolomics UHPLC–HRMS method [45] was applied. Liquid chromatography was used for separation, because it is highly suitable for analysis of metabolites in urine. The efficiency of the chromatographic separation was improved by use of ultra-high-performance liquid chromatography, and by favoring chromatographic resolution rather than high-throughput analysis. By using a C_{18}-based stationary phase and water–methanol gradient elution, this UHPLC method enabled the separation and detection of a large number of metabolites with different physicochemical properties, for example metabolites of different classes of pesticide. To achieve maximum metabolite coverage, this method of separation was combined with high-resolution mass spectrometry with electrospray ionization in the positive and negative modes. Classical electrospray ionization conditions were used, and mass spectra were acquired at high resolution to obtain accurate mass measurements and therefore gain access to a restricted set of proposed chemical formulas for the ions detected.

The purpose of this data acquisition was to compare different samples on the basis of signals representative of the concentration of the corresponding metabolites in urine, by using statistical analysis of the generated datasets. Taking into account that differences between samples were expected to be very small, the repeatability of data acquisition had to be carefully checked. To check this, six blank samples (mobile phase component

A) were analyzed within an analytical sequence of 40 urine samples, to confirm the absence of carry-over effects (results not shown). Second, internal standards were added to samples to normalize the signals of detected metabolites, reducing the analytical variability. Pesticides not detected in any of the urine samples from preliminary UHPLC–HRMS analysis were chosen as internal standards. On this basis, ethephon was chosen as internal standard for analysis performed in negative ESI mode and trifluralin, dichlorvos, and malathion for analysis in positive ESI mode. Finally, a quality-control (QC) sample, prepared by combining all the urine samples, was analyzed in replicate (n=6) during the analytical sequence. From the extracted ion chromatogram of a randomly selected ion in the QC results, no modification of chromatographic performances (shifts and variability of retention times (RT); and no significant variations of detector response (decrease and variability of the absolute signal) were observed during analytical sequences performed in both negative and positive-ionization modes. In the negative ionization mode, the m/z 283.0825 ion (within the m/z range of expected pesticide metabolites) observed at RT=8.4 min (almost in the middle of the chromatogram) was used for checking chromatographic and mass spectrometric performance stability. No changes of the RT were observed during the analytical sequence; the relative standard deviation (RSD) of RT was 0.3 %. The RSD of the corresponding chromatographic peak area was 9.9 %, with no significant downward trend of the signal along the sequence. The same results were obtained in positive-ionization mode on the basis of the m/z 257.1492 ion eluted at RT 9.1 min (RSD of RT=0.1 % and RSD of peak area=2.9 %).

Generation of the pesticide metabolite list

The objective of this work was to develop an "exposomics" approach able to discriminate individuals according to their living environment, focusing in particular on their environmental exposure to pesticides. Thus, the pesticides and metabolites monitored corresponded to pesticides used in local agricultural practice at the time the urine samples were collected (ca 2004). Pesticides were selected by using data from the results of surveys of Brittany, France, between 2001 and 2006, for crops which included corn, wheat, colza, peas, potatoes, and fresh vegetables (plus strawberries and melons) [46]; and recommendations of the French agricultural chamber and phytosanitary index published by ACTA [47].

From all these data, an initial list of 47 pesticides most likely to have been used in this area during the period of urine collection was produced (Table 1).

Data available on the metabolism of these 47 pesticides were then collected from the International Program on Chemical Safety (IPCS) database [48], the European Food Safety Authority report on pesticide residues in food [49], the Pesticide Properties Database from the University of Hertfordshire [50], and from "Metabolic Pathways of Agrochemicals" [51, 52]. Further information from the published scientific literature was added when available. Supplementary theoretical phase II metabolites of the already listed phase I metabolites were also added to the resulting metabolite list. This resulted in several metabolites considered to be relevant to mining of raw data for one given pesticide, as indicated in Table 1. Because of the structural similarity of some pesticides, some of their metabolites could be identical. For example, the organophosphorus compounds dichlorvos, malathion, and chlorpyrifos are all metabolized into (among others) dimethyldithiophosphate or dimethylthiophosphate. Thus, these metabolites may be regarded as biomarkers of exposure to organophosphorus insecticides in general but not to one specific compound [53]. In most cases evidence of the presence of pesticides was based on specific metabolites, e.g. dichlorvos glucuronide or desmethyl-dichlorvos for dichlorvos. However, the situation is more complex for some pesticides. For example, of 18 known metabolites of azinphos methyl, no specific metabolite could be used to monitor this pesticide (Table 1). Similarly, the same metabolites were monitored for such compounds as propachlor and dimethachlor. Therefore, for these compounds, only detection of the parent molecule would enable their specific identification. Despite these problems, all metabolites, including those with several possible origins, were monitored to assess exposure to at least one of the parent molecules listed. Finally, a list of 425 compounds (i.e. 378 metabolites and 47 parent molecules) was used when searching raw HRMS data.

Detection and identification of urinary pesticide metabolites

From the raw data acquired in an untargeted manner, compounds were screened on the basis of the theoretical mass of their quasi-molecular $[M + H]^+$ or $[M - H]^-$ ions, with mass measurement precision set at ±5 ppm. The theoretical exact masses of screened pesticides and metabolites were automatically calculated from their raw formula by using MetWorks. Signal detection and treatment were also performed by using MetWorks to study all 47 parent molecules. No signal-to-noise threshold was set, because, owing to the signal cut-off of the Fourier transform used to process the transient signal, the Orbitrap mass analyzer does not generate a noise level. To overcome this problem, an absolute signal threshold was set at 5×10^3 during at least five consecutive HRMS scans for ion selection. Thus, from the previously described list, 33 signals were detected in data

Table 1 The pesticides monitored and the corresponding number of metabolites screened

Common Name	Chemical group	Primary use	Screened metabolites
Acephate	Organophosphorus	Insecticide	17
Anthraquinone	Quinone	Fungicide	5
Azinphos-methyl	Organophosphorus	Insecticide	18
Azoxystrobin	Strobin	Fungicide	26
Benfuracarb	Carbamate	Insecticide	9
Carbendazim	Carbamate	Fungicide	6
Carbofuran	Carbamate	Insecticide	10 (plus nine in common with benfuracarb)
Carbosulfan	Carbamate	Insecticide	2 (plus nine in common with benfuracarb and ten in common with carbofuran)
Chlormequat	Quaternary ammonium	Growth regulator	5
Chlorothalonil	Substituted benzene	Fungicide	0
Chlorpropham	Carbamate	Herbicide	9
Chlorpyrifos	Organophosphorus	Insecticide	3 (plus 18 in common with azinphos-methyl)
Clomazone	Unclassified	Herbicide	6
Cymoxanil	Unclassified	Fungicide	3
Cypermethrin	Pyrethroid	Insecticide	3 (plus seven in common with lambda-cyhalothrin)
Deltamethrin	Pyrethroid	Insecticide	3 (plus seven in common with lambda-cyhalothrin)
Dichlorvos	Organophosphorus	Insecticide	5 (plus 18 in common with azinphos-methyl)
Dimethachlor	Acetanilide	Herbicide	4
Epoxiconazole	Azole	Fungicide	9
Ethephon	Organophosphorus	Growth regulator	5
Fenitrothion	Organophosphorus	Insecticide	10
Fenpropimorph	Morpholine	Fungicide	12
Glyphosate	Organophosphonate	Herbicide	5
Imidacloprid	Neonicotinoid	Insecticide	19
Iprodione	Dicarboximide	Fungicide	6
Kresoxim-methyl	Strobin	Fungicide	6
Lambda-cyhalothrin	Pyrethroid	Insecticide	7
Linuron	Urea	Herbicide	13
Malathion	Organophosphorus	Insecticide	10 (plus 18 in common with azinphos-methyl)
Metazachlor	Acetanilide	Herbicide	6
Metconazole	Azole	Fungicide	5
Methidathion	Organophosphorus	Insecticide	5 (plus 18 in common with azinphos-methyl)
Naled	Organophosphorus	Insecticide	8 (plus 18 in common with azinphos-methyl and five in common with dichlorvos)
Napropamide	Amide	Herbicide	12
Omethoate	Organophosphorus	Insecticide	2 (plus 18 in common with azinphos-methyl)
Oxydemeton-methyl	Organophosphorus	Insecticide	5
Paclobutrazol	Azole	Growth regulator	8
Pencycuron	Urea	Fungicide	13 (plus three in common with cymoxanil)
Permethrin	Pyrethroid	Insecticide	0 (plus seven in common with lambda-cyhalothrin and three in common with cypermethrin)
Phosalone	Organophosphorus	Insecticide	3 (plus 18 in common with azinphos-methyl)
Procymidone	Dicarboximide	Fungicide	19
Propachlor	Acetanilide	Herbicide	0 (plus four in common with dimethachlor)
Pirimicarb	Carbamate	Insecticide	10
Quizalofop-*p*-ethyl	Aryloxyphenoxy propionic acid	Herbicide	5
Tebuconazole	Azole	Fungicide	26
Thiophanate-methyl	Carbamate	Fungicide	9
Trifluralin	Dinitroaniline	Herbicide	6

acquired in the positive-ionization mode (128 signals in the negative-ionization mode) which fitted the exact masses of the listed pesticide metabolites (i.e. detection of an ion with an accurate mass in agreement with the theoretical mass of one of the screened metabolites). Several factors can affect efficiency of electrospray ionization, including the physicochemical properties of the analytes (e.g. pK_a). Consequently, detection of all the metabolites listed (if present) cannot be guaranteed in such an untargeted approach. At this stage, use of this method for quantitative purposes is precluded, because we deal mostly with compounds for which no reference standard is available. At best, only semi-quantitative data can be provided. Nevertheless, seeking a large set of metabolites increases the likelihood of detecting one of them under the experimental conditions used in this work.

When a potential metabolite was detected, structure was confirmed by a three-step process. The first step consisted in analyzing the isotopic pattern of the detected ion. This enabled confirmation (or not) of the possible identity of metabolites, in particular for sulfated, chlorinated, or brominated compounds, which have characteristic isotopic patterns. An example of this process is illustrated in Fig. 2, which depicts structural characterization of an azoxystrobin metabolite detected in the negative ion dataset at a retention time of 6.6 min (Fig. 2a). The *m/z* ratio measured for the suspected metabolite of azoxystrobin (*m/z* 287.0232, Fig. 2b) corresponded to the chemical formula $C_{11}H_{11}O_7S$ with a measurement error of 0.4 ppm (theoretically calculated *m/z* ratio=287.0231; Fig. 2c). This chemical formula was in

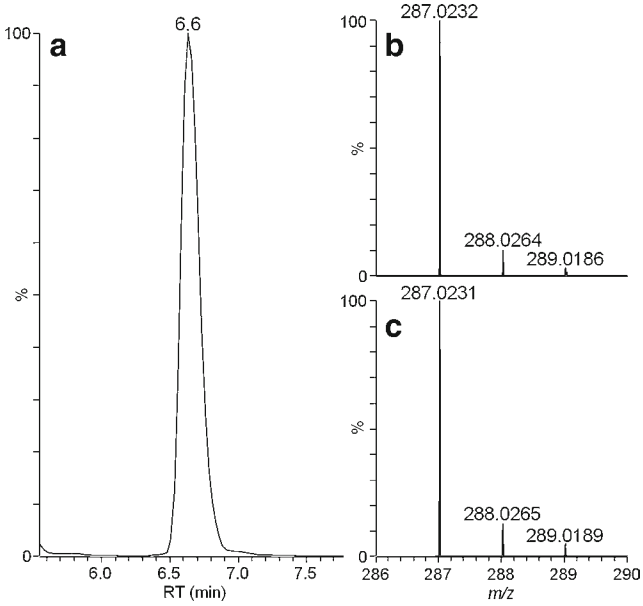


Fig. 2 Extracted ion chromatogram of the suspected methyl-2-(2-hydroxyphenyl)-3-methoxyacrylate sulfate ion (azoxystrobin) in urine samples (**a**), accurate mass measurement and isotopic pattern observed at RT=6.6 min (**b**), and theoretical isotopic pattern of $[C_{11}H_{12}O_7SH]^-$ (**c**)

agreement with the deprotonated form of methyl-2-(2-hydroxyphenyl)-3-methoxyacrylate sulfate, one of the 26 screened metabolites of azoxystrobin (Table 1). Moreover, the isotopic pattern of this ion was in good agreement with the chemical formula $C_{11}H_{11}O_7S$, with an [M + 2] ion corresponding to the ^{34}S isotope (Fig. 2) measured at *m/z* 289.0186 (theoretical *m/z* 289.0189, Δ=−1.0 ppm). It should also be noted that the resolving power (R=30,000) used in this work enabled separation of the $^{12}C_{11}{}^{1}H_{11}{}^{16}O_7{}^{34}S$ and $^{13}C_2{}^{12}C_9{}^{1}H_{11}{}^{16}O_7{}^{32}S$ ions at [M + 2].

When the exact mass and isotopic pattern were in agreement with the chemical formula of the hypothesized metabolite, the second step of the identification process consisted in conducting UHPLC–HRMS^n experiments on the targeted metabolite, using the linear ion trap of the LTQ-Orbitrap hybrid mass spectrometer. QC samples were used for this procedure. Phase II conjugated metabolites (i.e. glucuronide, sulfate, thiol, glutathione, etc.) could be easily identified by observation of characteristic MS^2 fragmentation patterns. In this way, several glucuronide and sulfate conjugates could be identified on the basis of the characteristic losses of 176 u ($C_6H_8O_6$) and 80 u (SO_3), respectively. The structures of phase II metabolites were also confirmed by MS^n experiments. As for metabolites produced by Phase I enzymes, identifications were either invalidated when observed fragment ions were inconsistent with the hypothesized structure (e.g. observation of loss of NH_3 with a hypothesized structure bearing no nitrogen atom) or were confirmed when observed fragment ions were in agreement with the putative metabolite structure. As an example, the MS–MS spectrum of the suspected metabolite of azoxystrobin detected at RT=6.6 min is reported in Fig. 3a. It contains a major fragment ion corresponding to the characteristic loss of SO_3 at *m/z* 207.0663 (Δ=0.04 ppm), consistent with the proposed sulfate conjugate structure of this metabolite. The MS^3 spectrum obtained from the *m/z* 207 fragment ion, reported in Fig. 3b, reveals the formation of two fragments ions, also in agreement with the structure of this metabolite (loss of CO_2, *m/z* 163.0767, Δ=1.4 ppm, and loss of $^{\bullet}C_4H_5O_2$, *m/z* 122.0376, Δ=2.1 ppm). In accordance with the metabolomics standard initiative (MSI) [54], metabolites identified at this stage were labeled as putatively characterized (level 3). After these UHPLC–HRMS^n experiments, 24 metabolites were putatively characterized among the 128 compounds detected in the raw data generated in the negative-ionization mode. Only five compounds were putatively characterized under positive-ionization conditions.

The final step of the identification process consisted in validating putative characterizations by comparison with spectral data obtained from authentic standards. Unfortunately, metabolites of xenobiotics are rarely commercially available, and none of the metabolites putatively characterized in this

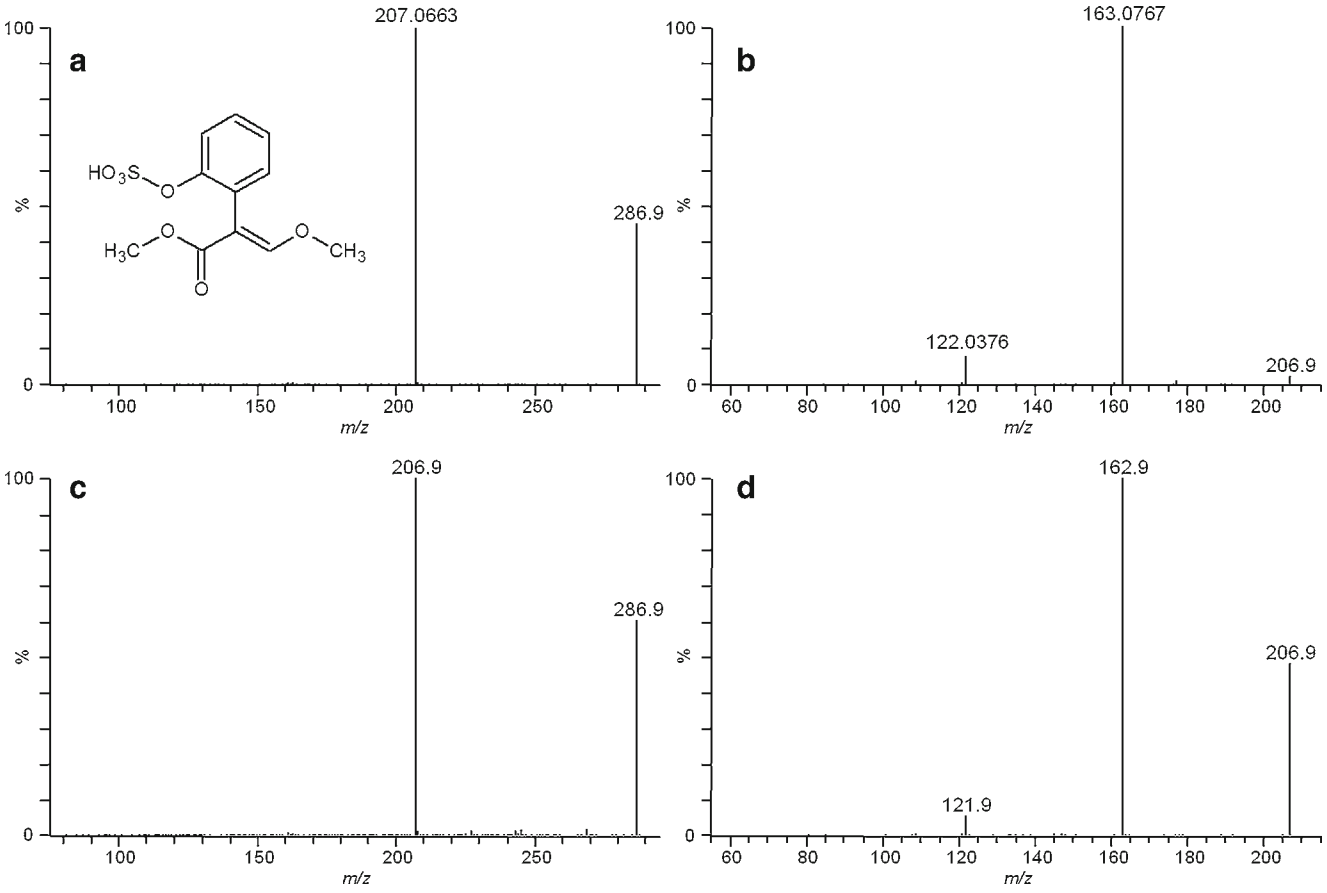


Fig. 3 MS–MS spectra of the suspected methyl-2-(2-hydroxyphenyl)-3-methoxyacrylate sulfate (azoxystrobin) ion obtained at RT=6.6 min in (**a**) human urine samples and (**c**) a rat urine sample, and MS^3 spectra of *m/z* 207 obtained at RT=6.6 min in (**b**) human urine samples and (**d**) a rat urine sample

study was available. Moreover, when parent molecules were available, they were not necessarily ionized with the same ionization mode as their metabolites, thus preventing validation of structures by using similarities of substructure spectra. The only exception was fenitrothion which was fragmented during the negative ionization process into 3-methyl-4-nitrophenol. This latter underwent loss of NO (−30 u) whereas the putative 3-methyl-4-nitrophenol ion generated from the suspected metabolite 3-methyl-4-nitrophenol sulfate underwent loss of 44 u. This information invalidated our hypothesized structure for this metabolite detected in the negative mode. For unchanged pesticides detected in samples, for example cymoxanil and carbofuran, the availability of the standard reference compounds enabled validation or invalidation of hypothetical identities. The suspected detection of cymoxanil in the positive mode (Table 2) was invalidated, because the standard compound did not elute at the same retention time (RT_{Std}=8.6 min, RT_{Sample}=2.4 min). In contrast, identification of carbofuran in the positive mode could be validated (level 1 [54]) by analysis of the authentic standard, which resulted in the same retention time (10.1 min), exact mass, isotopic pattern, and MS^2 spectrum as those of the detected urinary metabolite (results not shown).

Confirmation of metabolite structure by use of in-vivo-generated metabolites

In the absence of commercially available compounds, a small animal experiment was conducted to produce the hypothesized metabolites in vivo by administration of the corresponding parent compounds. After pesticide administration, analysis of rat urine under the same conditions as for human urine led to the detection of several metabolites with the same RT and *m/z* values, the same isotopic pattern, and the MS^2 and MS^3 spectra as detected for human metabolites. Returning to the example of methyl-2-(2-hydroxyphenyl)-3-methoxyacrylate sulfate detected in human urine as a putative metabolite of azoxystrobin, the MS^2 and MS^3 spectra generated from the human urinary metabolite are displayed in Fig. 3a and b, respectively, whereas the MS^2 and MS^3 spectra of the rat urinary metabolite detected at the same RT are presented in Fig. 3c and d. The MS and MS^n spectra of these two metabolites could be superimposed, enabling identification (level 1) of this metabolite in human urine.

Of the 24 metabolites putatively characterized by negative ESI analysis of human urine, 20 were successfully identified (level 1) by comparison with rat urine metabolites (Table 2).

Table 2 Compounds identified in human urine

Name	Ionization mode	Identification level [54]	Pesticide
Methyl-2-(2-hydroxyphenyl)-3-methoxyacrylate sulfate	ESI−	1	Azoxystrobin
Methyl-2-(2-hydroxyphenyl)-3-methoxyacrylate glucuronide (1)[a]	ESI−	1	Azoxystrobin
Methyl-2-(2-hydroxyphenyl)-3-methoxyacrylate glucuronide (2)[a]	ESI−	1	Azoxystrobin
2-Methyl-2-phenylpropanoic acid	ESI−	1	Fenpropimorph
2-Methyl-2-phenylpropanoic acid sulfate	ESI−	1	Fenpropimorph
2-Methyl-2-phenylpropanoic acid glucuronide	ESI−	1	Fenpropimorph
Hydroxy-2-methyl-2-phenylpropanoic acid (1)[a]	ESI−	3	Fenpropimorph
Hydroxy-2-methyl-2-phenylpropanoic acid (2)[a]	ESI−	3	Fenpropimorph
2-Methyl-2-[4-(2-carboxypropyl)phenyl)]propanoic acid	ESI−	1	Fenpropimorph
2-Methyl-2-[4-(2-carboxypropyl)phenyl)]propanoic acid sulfate	ESI−	1	Fenpropimorph
2-Methyl-2-[4-(2-carboxypropyl)phenyl)]propanoic acid glucuronide	ESI−	1	Fenpropimorph
2-Methyl-2-{4-[2-methyl-3-(*cis*-2-hydroxymethyl-6-methylmorpholin-4-yl]propyl)phenyl}propanoic acid glucuronide	ESI−	3	Fenpropimorph
3-Methyl-4-nitrophenol sulfate	ESI−	–[b]	Fenitrothion
1,2-Dimethylcyclopropane-1,2-dicarboxylic acid	ESI−, ESI+	1	Procymidone
2-(4-Hydroxyphenoxy)propanoic acid	ESI−	1	Quizalofop-*p*-ethyl
2-(4-Hydroxyphenoxy)propanoic acid glucuronide	ESI−	1	Quizalofop-*p*-ethyl
2-(4-Hydroxyphenoxy)propanoic acid sulfate (1)[a]	ESI−	1	Quizalofop-*p*-ethyl
2-(4-Hydroxyphenoxy)propanoic acid sulfate (2)[a]	ESI−	1	Quizalofop-*p*-ethyl
Propan-2-yl *N*-(3-chloro-4-hydroxyphenyl)carbamate sulfate	ESI−	1	Chlorpropham
Propan-2-yl *N*-(3-chloro-4-hydroxyphenyl)carbamate glucuronide	ESI−	1	Chlorpropham
Carbofuran	ESI+	1	Carbofuran
3,3-Dimethyl-2,3-dihydro-1-benzofuran-7-ol sulfate	ESI−	1	Carbofuran
3,3-Dimethyl-2,3-dihydro-1-benzofuran-7-ol glucuronide	ESI−	1	Carbofuran
7-Hydroxy-2,2-dimethyl-1-benzofuran-3(2*H*)-one	ESI−	1	Carbofuran
7-Hydroxy-2,2-dimethyl-1-benzofuran-3(2*H*)-one glucuronide	ESI−	1	Carbofuran
Cymoxanil	ESI+	–[b]	Cymoxanil
Hippuric acid	ESI+	3[c]	Pencycuron
2,6-Dimethylaniline	ESI+	3[c]	Metazalachlor

[a] *E* or *Z*

[b] Invalidated by comparison with the standard

[c] Not included in the statistical analysis because of the several possible origins of these compounds

One metabolite was invalidated (3-methyl-4-nitrophenol sulfate), and three metabolites remained as putatively characterized (level 3, [54]) because they were not detected in rat urine (possibly because of different metabolism in humans and rodents). By use of positive ionization, only five compounds were putatively characterized (Table 2). As previously stated, the analysis of the authentic standard invalidated the presence of cymoxanil, whereas carbofuran was confirmed (level 1). 1,2-Dimethylcyclopropane-1,2-dicarboxylic acid (Table 2) was detected at the same RT as in the negative ionization mode experiment, enabling its validation. Hippuric acid and 2,6-dimethylaniline were detected and identified in rat urine and can be attributed to metabolism of pencycuron and metazachlor, respectively. However, these compounds can also originate from exogenous compounds other than pesticides or even from endogenous substances, and thus were not validated as specific pesticide metabolites. Finally, only two compounds (i.e. carbofuran and 1,2-dimethylcyclopropane-1,2-dicarboxylic acid) were identified in the positive ionization dataset. Because both corresponded to compounds also detected (with better sensitivity) by use of negative ESI, relative quantification of metabolites was performed considering only the negative ionization dataset, on the basis of 23 metabolites reported in Table 2, representing 23 variables for statistical analysis.

Statistical data analysis

Semi-quantitative data (normalized peak areas for each of the 23 variables measured in urine samples from the 40 individuals) were first analyzed by use of PCA. This analysis

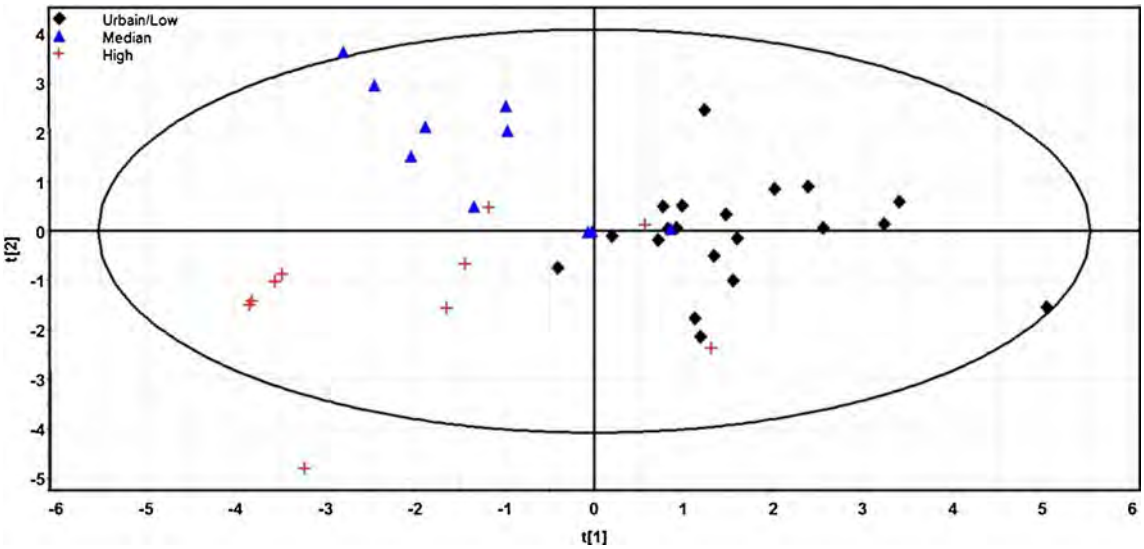


Fig. 4 Two-dimensional PLS-DA score plot of human urine samples for "urban + low exposure" (n=20), "medium exposure" (n=10), and "high exposure" (n=10) (R^2Y=51.9 % and Q^2=0.359)

revealed neither intrinsic cluster nor outlier individual (results not shown). PLS-DA was then used to model the relationship between exposure conditions and spectral data. In a first attempt, the constructed model was unable to separate the "urban" and "low exposure" groups. These two groups were then merged and a new model was constructed from three defined groups: "urban + low exposure", "medium exposure", and "high exposure". The resulting model revealed two components explaining 51.9 % of the variation (R^2) and with a predictive capacity (Q^2) of 0.359. The model was validated by use of a permutation test (results not shown). The score-plot obtained from the PLS-DA analysis, presented in Fig. 4, enables separation of the "urban + low exposure" group from the "medium exposure" + "high exposure" groups along the first axis, and between the "medium exposure" and "high exposure" groups along the second axis. Discriminating metabolites are reported in Table 3, with their variation trends between groups. Eight metabolites were revealed to be significantly different among groups, with a VIP value >1.0 and a Kruskal–Wallis test p-value <0.05 (Table 3). Among these metabolites, 2-(4-hydroxyphenoxy)propanoic acid sulfate contributed to separation of the three groups (p-value <0.05) but did not enable significant separation of the groups two by two. For the seven other metabolites, a significant increase (+) of their signal and, therefore, of their urinary concentration, resulted from the exposure conditions (Table 3). For methyl-2-(2-hydroxyphenyl)-3-methoxyacrylate sulfate, the E and Z isomers of the glucuronide metabolites of methyl-2-(2-hydroxyphenyl)-3-methoxyacrylate, and 2-methyl-2-phenylpropanoic acid the p-value was $<10^{-4}$, indicating that these four metabolites made strong contributions to discrimination between the groups. In contrast, the p-values of the four other metabolites were $>3\times10^{-3}$. The concentration variations of the four most significant

Table 3 Variation of signals as a result of exposure

Metabolite	p-value	(Urban + low)/medium	(Urban + low)/high	Medium/high
Methyl-2-(2-hydroxyphenyl)-3-methoxyacrylate sulfate	6.5×10^{-6}	+	+	n.s.
2-Methyl-2-phenylpropanoic acid	2.2×10^{-5}	+	+	n.s.
Methyl-2-(2-hydroxyphenyl)-3-methoxyacrylate glucuronide (1)[a]	9.6×10^{-5}	+	+	n.s.
Methyl-2-(2-hydroxyphenyl)-3-methoxyacrylate glucuronide (2)[a]	6.3×10^{-5}	+	+	n.s.
3,3-Dimethyl-2,3-dihydro-1-benzofuran-7-ol sulfate	0.0197	n.s.	+	n.s.
3,3-Dimethyl-2,3-dihydro-1-benzofuran-7-ol glucuronide	0.0409	+	n.s.	n.s.
7-Hydroxy-2,2-dimethyl-1-benzofuran-3(2*H*)-one glucuronide	0.0033	n.s.	+	+
2-(4-Hydroxyphenoxy)propanoic acid sulfate (2)[a]	0.0404	n.s.	n.s.	n.s.

[a] E or Z

+, increase in the signal

n.s., not significant

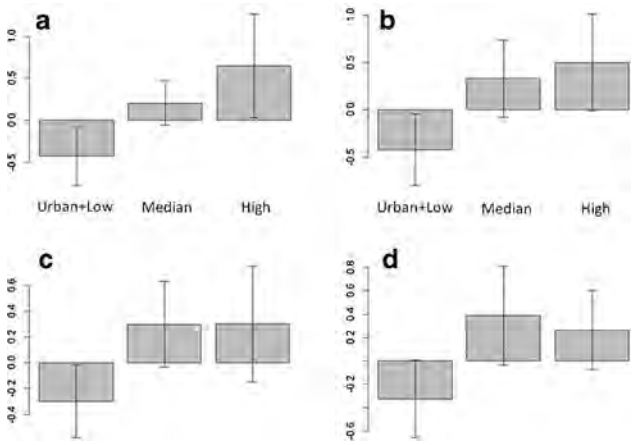


Fig. 5 Variation of filtered normalized signals of (**a**) methyl-2-(2-hydroxyphenyl)-3-methoxyacrylate sulfate, (**b**) 2-methyl-2-phenylpropanoic acid, (**c**) methyl-2-(2-hydroxyphenyl)-3-methoxyacrylate glucuronide (1; *E* or *Z*), and (**d**) methyl-2-(2-hydroxyphenyl)-3-methoxyacrylate glucuronide (2; *E* or *Z*) in human urine samples

metabolites according to exposure group are presented in Fig. 5, which reveals significant increases in concentration with increasing exposure. Therefore, according to the statistical model generated by untargeted biomonitoring of 40 subjects, exposure could be characterized on the basis of four metabolites of two fungicides, azoxystrobin and fenpropimorph, classically used as pesticides for treatment of cereal crops.

Conclusion

Exposure of a population to contaminants may be estimated either by monitoring biological samples collected from the population or by measurement of chemical concentrations in the environment, including food [55, 56]. However, most of the time, biomonitoring considers substances taken individually, and current approaches do not address co-exposure. This question is of growing concern and must be considered in future analytical strategies. This entails introduction of techniques and concepts enabling identification, without a-priori consideration, of a variety of (potentially unknown or putative) metabolites representative of a pattern of exposure.

The purpose of the "exposomics" method developed in this work was to obtain untargeted evidence of urinary metabolites resulting from exposure to pesticides. The method is based on LC–HRMS measurements in both positive and negative modes of electrospray ionization coupled to in-vivo-generation of metabolites used as standards for confirmation of metabolite structure, as a preliminary step enabling establishment of a link between urinary biomarkers and exposure to several pesticides. In our study, among the 47 pesticides initially selected for data mining, only two (azoxystrobin and fenpropimorph) were found to discriminate among the sub-populations according to their levels of environmental exposure. Although designed for assessment of feasibility and performed on a limited scale (40 subjects), this study clearly showed that two pesticides used for cereal crop treatment were present at higher levels in women living close to areas where cereal crops were grown. This study also confirmed the relevance of the exposure indicators used in this kind of epidemiological approach (agricultural practice, distance from agricultural fields). Our results may lead to more comprehensive studies for discovery of other metabolites suitable for screening in further biomonitoring studies. This approach may also be useful for refining group definition in epidemiological studies by use of predictive statistical models. Extension of this approach to a greater number of urine samples is in progress, and could be part of a validation process.

Work is also in progress to improve this approach, to ensure wider xeno-metabolome coverage and to extend its application to the identification of other metabolites as markers of exposure to other types of contaminant, for example mycotoxins or PAHs, to contribute meeting the challenge of multiple exposure assessment.

Acknowledgments The authors would like to thank Marion Gaudicheau for her participation in this work. Elisabeth Jeunesse and Florence Blas-y-Estrada (INRA Toxalim, Toulouse, France) are also thanked for the animal experiment. This work was achieved within the MetaToul–AXIOM analytical program and was supported by INRA-AlimH research division and by the French Ministry of Environment in a national program Grenelle de l'Environnement programme LOLF 189 funding (EXPiOmark).

References

1. US-EPA (2011) Pesticides industry sales and usage. http://www.epa.gov/opp00001/pestsales/07pestsales/market_estimates2007.pdf. 2013
2. UIPP (2011-2012) Rapport d'activité (Acitivity report). http://asp.zone-secure.net/v2/indexPop.jsp?id=4419/5741/25126&lng=fr. 2013
3. Mnif W, Hassine AIH, Bouaziz A, Bartegi A, Thomas O, Roig B (2011) Effect of endocrine disruptor pesticides: a review. Int J Environ Res Public Health 8:2265–2303
4. Kamel F, Enge LS, Gladen BC, Hoppin JA, Alavanja MCR, Sandler DP (2007) Neurologic symptoms in licensed pesticide applicators in the Agricultural Health Study. Hum Exp Toxicol 26:243–250
5. Kamel F, Tanner CM, Umbach DM, Hoppin JA, Alavanja MCR, Blair A, Comyns K, Goldman SM, Korell M, Langston JW, Ross GW, Sandler DP (2007) Pesticide exposure and self-reported Parkinson's disease in the agricultural health study. Am J Epidemiol 165:364–374
6. Blanc-Lapierre A, Bouvier G, Garrigou A, Canal-Raffin M, Raherison C, Brochard P, Baldi I (2012) Effets chroniques des pesticides sur le système nerveux central: état des connaissances épidémiologiques (Chronic effects of pesticides on the central nervous system: current epidemiological knowledge). Rev Epidemiol Santé Publique 60:389–400

7. Sever LE, Arbuckle TE, Sweeney A (1997) Reproductive and developmental effects of occupational pesticide exposure: the epidemiologic evidence. Occup Med State Art Rev 12:305–325
8. Bretveld RW, Thomas CMG, Scheepers PTJ, Zielhuis GA, Roeleveld N (2006) Pesticide exposure: the hormonal function of the female reproductive system disrupted? Reprod Biol Endocrinol 4:1–14
9. Bretveld R, Brouwers M, Ebisch I, Roeleveld N (2007) Influence of pesticides on male fertility. Scand J Work Environ Health 33:13–28
10. Weselak M, Arbuckle TE, Foster W (2007) Pesticide exposures and developmental outcomes: the epidemiological evidence. J Toxicol Environ Health B Crit Rev 10:41–80
11. Dich J, Zahm SH, Hanberg A, Adami HO (1997) Pesticides and cancer. Cancer Causes Control 8:420–443
12. Zahm SH, Ward MH, Blair A (1997) Pesticides and cancer. Occup Med State Art Rev 12:269–289
13. Merhi M, Raynal H, Cahuzac E, Vinson F, Cravedi JP, Gamet-Payrastre L (2007) Occupational exposure to pesticides and risk of hematopoietic cancers: meta-analysis of case-control studies. Cancer Causes Control 18:1209–1226
14. Weichenthal S, Moase C, Chan P (2010) A review of pesticide exposure and cancer incidence in the Agricultural Health Study Cohort. Environ Health Perspect 118:1117–1125
15. ANSES (2010) Exposition de la population générale aux résidus de pesticides en France : Synthèse et recommandations du comité d'orientation et de prospective scientifique de l'observatoire des résidus de pesticides, ORP (Exposure of the general population to pesticide residues in France: Summary and recommendations of the steering and the scientific prospective committee of the pesticide residues observatory , PRO). Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. http://www.observatoire-pesticides.gouv.fr/upload/bibliotheque/171959218396043870616875052847/exposition_population_generale_pesticides_2010_vdef.pdf. 2013
16. Aprea MC (2012) Environmental and biological monitoring in the estimation of absorbed doses of pesticides. Toxicol Lett 210:110–118
17. Needham LL, Calafat AM, Barr DB (2007) Uses and issues of biomonitoring. Int J Hyg Environ Health 210:229–238
18. Lu CS, Rodriguez T, Funez A, Irish RS, Fenske RA (2006) The assessment of occupational exposure to diazinon in Nicaraguan plantation workers using saliva biomonitoring. In: Mehlman MA, Soffritti M, Landrigan P, Bingham E, Belpoggi F (ed) Living in a chemical world: framing the future in light of the past, vol 1076. Annals of the New York Academy of Sciences. Blackwell Publishing, Oxford, pp 355-365
19. Porta M, Puigdomenech E, Ballester F, Selva J, Ribas-Fito N, Llop S, Lopez T (2008) Monitoring concentrations of persistent organic pollutants in the general population: the international experience. Environ Int 34:546–561
20. Esteban M, Castano A (2009) Non-invasive matrices in human biomonitoring: a review. Environ Int 35:438–449
21. Harris SA, Villeneuve PJ, Crawley CD, Mays JE, Yeary RA, Hurto KA, Meeker JD (2010) National study of exposure to pesticides among professional applicators: an investigation based on urinary biomarkers. J Agric Food Chem 58:10253–10261
22. Fujii Y, Ito Y, Harada KH, Hitomi T, Koizumi A, Haraguchi K (2012) Comparative survey of levels of chlorinated cyclodiene pesticides in breast milk from some cities of China, Korea and Japan. Chemosphere 89:452–457
23. Bradman A, Whyatt RM (2005) Characterizing exposures to nonpersistent pesticides during pregnancy and early childhood in the National Children's Study: a review of monitoring and measurement methodologies. Environ Health Perspect 113:1092–1099
24. Ueyama J, Saito I, Kamijima M (2010) Analysis and evaluation of pyrethroid exposure in human population based on biological monitoring of urinary pyrethroid metabolites. J Pestic Sci 35:87–98
25. Sleeuwenhoek A, Cocker J, Jones K, Cherrie JW (2007) Biological monitoring of pesticide exposures. Research Report TM/07/02. IOM. http://www.iom-world.org/research/report_list.php?pageNum_listReports=1&totalRows_listReports=469. 2011
26. Bouvier G, Seta N, Vigouroux-Villard A, Blanchard O, Momas I (2005) Insecticide urinary metabolites in nonoccupationally exposed populations. J Toxicol Environ Health B Crit Rev 8:485–512
27. Aprea C, Colosio C, Mammone T, Minoia C, Maroni M (2002) Biological monitoring of pesticide exposure: a review of analytical methods. J Chromatogr B 769:191–219
28. Barr DB, Needham LL (2002) Analytical methods for biological monitoring of exposure to pesticides: a review. J Chromatogr B 778:5–29
29. Margariti MG, Tsakalof AK, Tsatsakis AM (2007) Analytical methods of biological monitoring for exposure to pesticides: recent update. Ther Drug Monit 29:150–163
30. Le Bizec B, Pinel G, Antignac JP (2009) Options for veterinary drug analysis using mass spectrometry. J Chromatogr A 1216:8016–8034
31. Bicker W, Lammerhofer M, Genser D, Kiss H, Lindner W (2005) A case study of acute human chlorpyrifos poisoning: novel aspects on metabolism and toxicokinetics derived from liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of urine samples. Toxicol Lett 159:235–251
32. Ahn KC, Watanabe T, Gee SJ, Hammock BD (2004) Hapten and antibody production for a sensitive immunoassay determining a human urinary metabolite of the pyrethroid insecticide permethrin. J Agric Food Chem 52:4583–4594
33. Shim WB, Yakovleva ME, Kim KY, Nam BR, Vylegzhanina ES, Komarov AA, Eremin SA, Chung DH (2009) Development of fluorescence polarization immunoassay for the rapid detection of 6-chloronicotinic acid: main metabolite of neonicotinoid insecticides. J Agric Food Chem 57:791–796
34. Colume A, Cardenas S, Gallego M, Valcarcel M (2001) A solid phase extraction method for the screening and determination of pyrethroid metabolites and organochlorine pesticides in human urine. Rapid Commun Mass Spectrom 15:2007–2013
35. Maurer HH (2007) Current role of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical and forensic toxicology. Anal Bioanal Chem 388:1315–1325
36. Dresen S, Ferreiros N, Gnann H, Zimmermann R, Weinmann W (2010) Detection and identification of 700 drugs by multi-target screening with a 3200 Q TRAP(A (R)) LC-MS–MS system and library searching. Anal Bioanal Chem 396:2425–2434
37. Polettini A, Gottardo R, Pascali JP, Tagliaro F (2008) Implementation and performance evaluation of a database of chemical formulas for the screening of pharmaco/toxicologically relevant compounds in biological samples using electrospray ionization-time-of-flight mass spectrometry. Anal Chem 80:3050–3057
38. Pelander A, Ojanpera I, Laks S, Rasanen I, Vuori E (2003) Toxicological screening with formula-based metabolite identification by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. Anal Chem 75:5710–5718
39. Lee HK, Ho CS, Iu YPH, Lai PSJ, Shek CC, Lo YC, Klinke HB, Wood M (2009) Development of a broad toxicological screening technique for urine using ultra-performance liquid chromatography and time-of-flight mass spectrometry. Anal Chim Acta 649:80–90
40. Broecker S, Herre S, Wust B, Zweigenbaum J, Pragst F (2011) Development and practical application of a library of CID accurate mass spectra of more than 2,500 toxic compounds for systematic toxicological analysis by LC-QTOF-MS with data-dependent acquisition. Anal Bioanal Chem 400:101–117
41. Peters RJB, Stolker AAM, Mol JGJ, Lommen A, Lyris E, Angelis Y, Vonaparti A, Stamou M, Georgakopoulos C, Nielen MWF

(2010) Screening in veterinary drug analysis and sports doping control based on full-scan, accurate-mass spectrometry. Trends Anal Chem 29:1250–1268
42. Petit C, Blangiardo M, Richardson S, Coquet F, Chevrier C, Cordier S (2002) Association of environmental insecticide exposure and fetal growth with a Bayesian model including multiple exposure sources. Am J Epidemiol 175:1182–1190
43. Agreste (2000) Recensement agricole (Agricultural census). Ministere de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt. http://agreste.agriculture.gouv.fr/enquetes/recensement-agricole/. 2011
44. Wold S, Antti H, Lindgren F, Ohman J (1998) Orthogonal signal correction of near-infrared spectra. Chemometr Intell Lab Syst 44:175–185
45. Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD (2007) Mass spectrometry-based metabolomics. Mass Spectrom Rev 26:51–78
46. COREP Bretagne (2011) Liste des études suivies par la COREP (List of studies undertaken by COREP). Ministere de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt. http://draf.bretagne.agriculture.gouv.fr/corpep/spip.php?article166. 2011
47. Association de Coordination Technique Agricole ACTA, Couteux A, Lejeune V (2004) Index phytosanitaire 2004. ACTA, 149 rue de Bercy, Paris, France
48. IPCS INCHEM (2011) Pesticides data sheets and environmental health criteria. http://www.inchem.org/pages/pds.html. 2011
49. European Food Safety Authority (2010) 2008 annual report on pesticide residues. EFSA J 8:1646–2088
50. University of Hertfordshire (2011) PPDB: Pesticide Properties DataBase. http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/index.htm. 2011
51. Roberts TR (1999) Metabolic pathways of agrochemicals: part 2: insecticides and fungicides. Royal Society of Chemistry, Cambridge
52. Roberts TR, Hutson DH (1998) Metabolic pathways of agrochemicals: part 1: herbicides and plant growth regulators. Royal Society of Chemistry, Cambridge
53. Ueyama J, Saito I, Kondo T, Taki T, Kimata A, Saito S, Ito Y, Murata K, Iwata T, Gotoh M, Shibata E, Wakusawa S, Kamijima M (2012) Urinary concentrations of organophosphorus insecticide metabolites in Japanese workers. Chemosphere 87:1403–1409
54. Sumner LW, Amberg A, Barrett D, Beale MH, Beger R, Daykin CA, Fan TWM, Fiehn O, Goodacre R, Griffin JL, Hankemeier T, Hardy N, Harnly J, Higashi R, Kopka J, Lane AN, Lindon JC, Marriott P, Nicholls AW, Reily MD, Thaden JJ, Viant MR (2007) Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. Metabolomics 3:211–221
55. Krieger RI, Chen L, Ginevan M, Watkins D, Cochran RC, Driver JH, Ross JH (2012) Implications of estimates of residential organophosphate exposure from dialkylphosphates (DAPs) and their relevance to risk. Regul Toxicol Pharmacol 64:263–266
56. Hays SM, Aylward LL, Driver J, Ross J, Kirman C (2012) 2,4-D exposure and risk assessment: comparison of external dose and biomonitoring based approaches. Regul Toxicol Pharmacol 64:481–489

METABOLOMICS-BASED BIOLOGICAL MARKERS OF PERINATAL IMPRINTING: EVIDENCES IN THE FIELD OF TOXICOLOGY, FROM STUDIES IN ANIMALS EXPOSED TO ENDOCRINE DISRUPTORS AND HUMAN EXPOSED TO PESTICIDES

Zalko D[1]*, Bonvallot N[2], Tremblay-Franco M[3], Soto AM[4], Chevrier C[5], Vinson F[1], Cravedi JP[1], Sonnenschein C[4], Jourdan F[1], Gauthier R[3], Cordier S[5], Debrauwer L[3], Wadia PR[4], Cabaton N[1], Canlet C[3].

1 INRA - UMR 1331 TOXALIM, Metabolism of Xenobiotics, 180 chemin de tournefeuille, BP 93173, 31027 Toulouse cedex 3, France. **2** EHESP School of Public Health, Avenue du Professeur Léon Bernard, CS74312, F-35043 Rennes Cedex, France. **3** INRA - UMR 1331 TOXALIM, AXIOM-Metatoul, 180 chemin de tournefeuille, BP 93173, 31027 Toulouse cedex 3, France. **4** Department of Anatomy and Cellular Biology, Tufts University School of Medicine, 136 Harrison Avenue, Boston, 02111 Massachusetts, USA. **5** INSERM UMR 1085 (IRSET), Université Rennes 1 - campus de Beaulieu, Avenue du général Leclerc, 35 042 Rennes Cedex, France.

Introduction

Untargeted metabolomics is a global approach aiming at the analysis of the metabolome, e.g. the largest possible set of small metabolites present in biological samples. Metabolomics is increasingly used in the field of toxicology, with the aim of characterizing the global and dynamic response of living systems. Human tissues, cells and accessible samples (blood, urine) from groups exposed to various doses of potentially harmful chemicals can be used. Metabolomics can be based on a variety of spectrometric techniques, such as Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Mass Spectrometry (MS). Results are processed using multivariate statistics to seek for variables (key metabolites) that discriminate between groups ("metabolic fingerprints"). Novel developments in MS such as High Resolution MS (HRMS) have further extended spectral possibilities, and bio-informatics pipelines have been developed for the interpretation of these data in the context of "metabolic networks" paving the way for the study of the metabolome modulation by chemicals. In the present study, we show that metabolomics can be used in the field of toxicology, to unveil a modulation of the metabolic network in animals exposed during critical windows of vulnerability, even for very low doses of contaminants. This conclusion is based on perinatal studies on endocrine disruptors such as bisphenol A (BPA) and diethylstilbestrol (DES). The persistence of metabolomic changes long after the end of exposure suggests the feasibility of developing markers of past exposure. Metabolomics can also be used to gain a better understanding of cell physiology. Although the human situation *in vivo* is by far more complex (exposure to mixtures of compounds, genetic variability, physiological status) preliminary evidence suggests metabolomics studies on pesticide exposure can contribute successfully to highlight differences connected with the exposure status.

Materials and methods

All samples from animals and human used in this study (rats/mice: serum, tissue extracts; human: urine) were prepared for spectral analysis (NMR or MS) using the protocols detailed in Cabaton et al.[1] and Bonvallot et al.[2]. Samples were submitted to ^{1}H-NMR spectroscopy at 600.13MHz (Bruker Avance DRX-600 spectrometer fitted with a cryoprobe). For MS extracts, we used ultra high performance liquid chromatography coupled to high resolution MS (UHPLC-HRMS). The UHPLC system was a RSLC3000 (Dionex-Thermo Scientific, Les Ulis, France). Eluted compounds were detected using a LTQ-Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Scientific les Ulis, France) equipped

with an electrospray ionization source. For each spectrum, baseline and phase correction, data reduction, and bucketing multivariate analyses were used to evaluate the treatments on the metabolome. We first performed PCA to reveal intrinsic treatment-related clusters and detect eventual outliers. PLS-DA was then used to model the relationship between group and spectral data. We used orthogonal signal correction filtering[3] to remove variation not linked to the treatment. Filtered data were mean centered and scaled seven-fold cross-validation was used to determine the number of latent variables to be included in the PLS-DA models and to estimate the predictive ability (Q^2 score) of the adjusted models. The model is considered to be valid for a Q^2 score above 0.4[4]. Discriminant variables were determined using VIP (variable importance in the projection). We used this global measure of the influence of each variable on the PLS components to derive a subset of the most important metabolites for the separation of experimental groups. Then, we used the Kruskal–Wallis test to determine which metabolites were significantly different between groups. SIMCA-P software (V12; Umetrics AB, Umea, Sweden) was used to perform the multivariate analyses. Modeling of metabolic networks was carried out as detailed elsewhere[5] and with the help of the INRA Metexplore server we have developed (www.metexplore.fr).

Results and discussion

In vivo use of metabolomics and the case of endocrine disruptors: unveiling the effects of perinatal exposure for low doses of contaminants. We recently demonstrated that NMR-based metabolic fingerprints can successfully be used to discriminate among mouse pups whose mothers had been exposed to very low doses of BPA [0, 25, 250, or 2500 ng/kg body weight (BW)] during pregnancy and early lactation[1] (Figure 1). BPA is a model xeno-estrogen, to which a major part of the human population is chronically exposed. Human exposure occurs in the ng/kg range[6]. An extensive literature has been published about the low dose effects of BPA. In rodents, perinatal exposure studies have demonstrated BPA's effects on fertility, fecundity, and reproductive tissues (mammary gland, prostate…)[6].

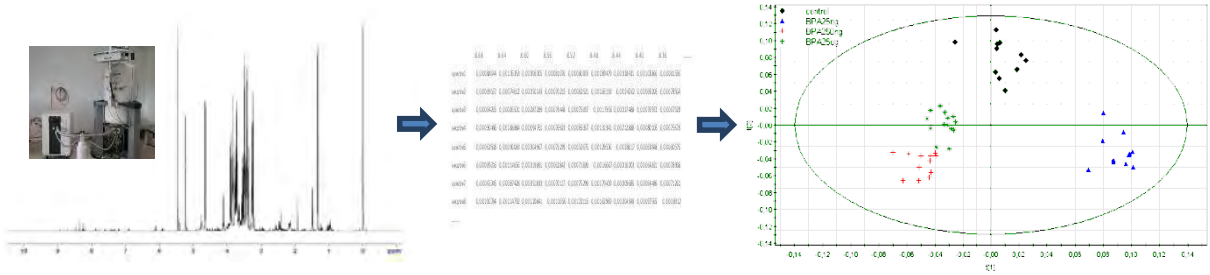


Figure 1. NMR-based metabolomics discrimination of mice tissue extracts from animals exposed to low doses of BPA from gestational day 8 to postnatal day 15. Right plot: two-dimensional PLS-DA scores plot for the brain at postnatal day 21, in males from mothers exposed to 0 (black), 0.025 (blue), 0.25 (red) or 25 µg/kg (green) BPA (1st and 2nd latent variable out of 3 components: R^2Y=78.9%, Q^2=0.564). Similar intergroup separation can be obtained based on liver and serum extracts[1].

Fetal exposure to xeno-estrogens and other endocrine disruptors result in pathologies and adverse effects, the incidence of which is increasing in human populations over the last decades. As for other chemicals, a direct link between exposure and adverse effects in humans cannot be demonstrated based on a direct experimentation for obvious ethical reasons. However, one record of such an "experiment" exists for a xeno-estrogen; a large number of pregnant women were prescribed diethylstilboestrol (DES), in the nineteen sixties and seventies. Striking similarities in the effects of DES and other xeno-estrogens have been shown in animal models, and mimic the symptoms observed in boys and girls whose pregnant mothers were exposed to DES. In experiments carried out on mice using a protocol similar to the one developed for BPA[1], during which mothers were exposed to 10 ng/kg BW DES, liver extracts from F1 male animals were examined using the NMR metabolic fingerprints approach. Exposed animals and controls were easily discriminated, with extremely high scores, and a very robust model in which more than 99% of the variability was explained by the treatment (Figure 2).

Metabolites	1H NMR chemical shift δ (ppm)	Whole body PND2	Serum PND21	Liver PND21	Brain PND21
Cholines	3.20(s); 3.22(s); 3.23(s)	↑	↑	↓	↓
Lactate	1.33(d); 4.11(q)	↑	↓	↓	
Glucose	3.54(m); 3.66(m); 3.70(m); 3.74(m); 3.78(m); 3.82(m); 3.86(m); 3.90(m)	↑	↑	↓	
Creatine	3.03(s); 3.93(s)	↑			
Glutamate	2.08(m); 2.34(m)			↑	↓
Taurine	3.26(t); 3.42(t)		↑	↑	
Glutamine	2.14(m); 2.46(m)				↑
Lipids (LDL/VLDL)	0.86(m); 0.90(m); 1.26(m); 1.30(m)		↓		
Valine/Leucine/Isoleucine	0.94(d); 0.96(d); 1.0(d); 1.01(d); 1.05(d)	↓			
Lysine	1.72(m); 2.98(m)	↓			
Glutathione	2.17(m); 2.56(m); 2.94(m)			↑	
Glycogen	5.42(m)			↓	
Aspartic acid	2.65(dd); 2.80(dd)				↑
GABA	1.90(q); 2.27(t); 3.01(t)				↓

Figure 2. NMR-based metabolomics discrimination of mice liver extracts based on pregnant animals exposed to DES (sub-cutaneous explants in mothers delivering 10 ng DES/kg/day from gestational day 8 to postnatal day 16). Two dimensional PLS-DA scores plot at postnatal day 21. Red : DES exposed mice; Black : controls. 1st and 2nd latent variable out of 3 components are displayed, with R^2Y=99.1% (82.3, 14.5 & 2.3% on the 1st, 2nd and 3rd axis, respectively) and an extremely high Q^2 score of 0.952 (0.617, 0.695 & 0.587, respectively).

In the case of BPA, the variables discriminating among groups, for serum and liver samples (Figure 3) suggest a disruption of the energy metabolism; this is consistent with previous results obtained in conventional studies[7,8], indicating that early exposure to BPA later disrupts energy balance and glucose metabolism. Similar effects of xeno-estrogens have also been reported for DES in rodents[9]. When considered at the level of a single tissue (for instance serum, Figure 3, red box), these variables, can be used as phenotypic biomarkers of early exposure.

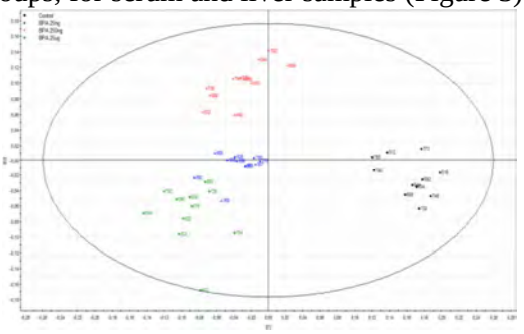


Figure 3. Summary of the discriminant metabolites for postnatal days 2 and 21 mice exposed to BPA in the perinatal period (arrows: variation compared to controls; based on the results obtained by Cabaton et al, 2013)[1].

Persistent effects of perinatal imprinting. On-going studies on BPA suggest that gestational exposure not only triggers a significant change in the metabolome at birth, but also that these changes persist long after exposure has ceased. Female mice exposed gestationally and during lactation show a pattern that allows for discrimination among groups even at 3 month of age, demonstrating persisting effects of perinatal imprinting (Figure 4). At this stage, F1 females exposed both gestationally and through lactation had not been further exposed to BPA for at least 2½ month.

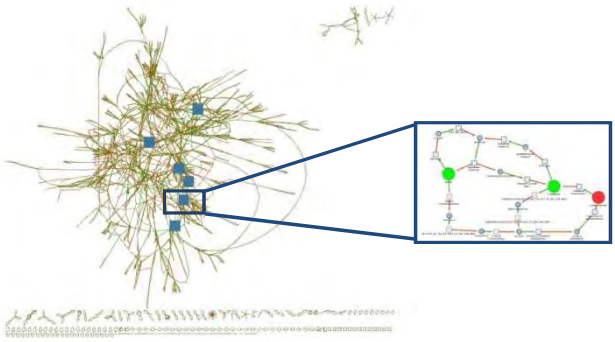
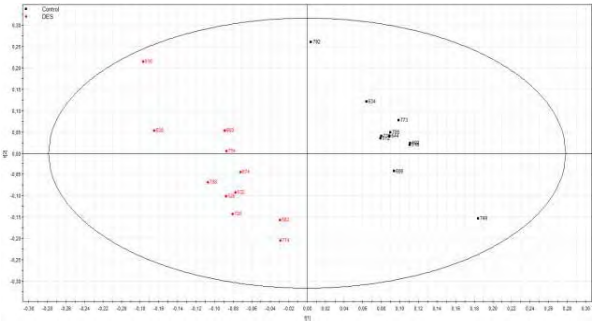


Figure 4. NMR-based metabolomics discrimination of F1 female mouse liver extracts, from animals exposed to BPA solely during the perinatal period (same protocol as detailed for males in Fig. 1). Two-dimensional PLS-DA scores plot at postnatal day 90. R^2Y=69.8%, Q^2=0.595.



Understanding the underlying metabolic shifts through metabolic networks modeling. Metabolic fingerprints can be successfully used to discriminate between exposed/unexposed groups. They can be applied to *in vivo* or *in vitro* samples. The latter approach, already applied to BPA and halogenated contaminants, can be used to further explore which metabolic pathways are shifted within genome scale metabolic networks (integration of all possible metabolic reactions that can be performed by the organism). This bioinformatics approach also aims at identifying which reactions and related enzymes are involved in the metabolic response. Hence, combining physiological relevance of metabolomics data and recent advances in genomic technologies will result in improving systems biology research in the field of toxicology.

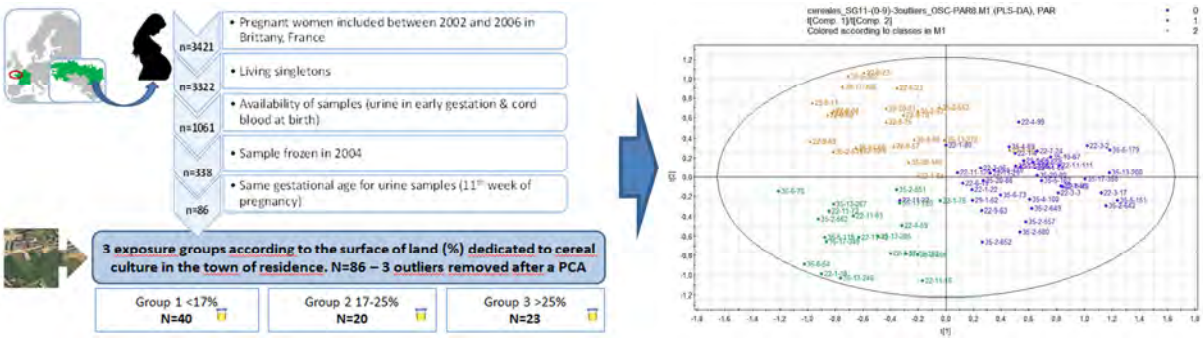
Figure 5 illustrates this approach with the extraction (through modeling) of the brain sub-network corresponding to the pathways involved in metabolic shifts for male mice perinatally exposed to low doses of BPA[1].

Relevance to the human situation. These results suggest that metabolomics can be used in the field of toxicology, and is especially suitable to examine the effects of low dose exposure to chemicals. Metabolomic profiling promises to be particularly useful when the compound(s) responsible for these effects cannot be monitored, and when exposure occurred during critical windows of vulnerability.

Still, the situation in humans is rather complex. First, human exposure is not limited to a single compound. Second, human genetic variability is greater than that of laboratory animal models, even if outbred animal strains are used as we did for the BPA studies. Additional factors such as the physiological status can also complicate metabolomic analyses by enhancing variability. In this context, it is desirable to select specific human sub-populations and specific exposure situations to investigate the use of metabolomics as relevant biomarkers of exposure and effect.

We recently examined the metabolomic profile in humans, in the context of global exposure to agro-chemicals[2] (Figure 6). Our work examined a cohort of pregnant women in Brittany (France), for which we studied the links between exposure to multiple pesticides during early pregnancy, and urinary metabolomic biomarkers. We selected 3 groups of women potentially exposed to pesticides, according to the surface of land dedicated to cereal crops culture in their area of residence. Besides chemometric results based on NMR and PLS-DA, polytomous regression were adjusted for potential confounders (BMI, age, parity, smoking habits).

Figure 6. Flowchart of the selection of the exposure groups and two-dimensional PLS-DA score plot for urinary samples from 83 pregnant women living in towns were 0-17% (purple), 17-25% (green) or more than 25% (orange) of the surface of land is dedicated to cereal crops[2]. The PLS-DA model includes 4 latent variables with a R^2Y=90.7%, and a Q^2=0.564.



Again, it was possible to discriminate among the 3 groups, with a large part of the variability explained by the exposure scenario, and a fully valid model, although characterized by a lower Q^2 score than for less complex models (e.g. laboratory animals exposed to a single compound). Thus, despite the many factors which enhance variability in human models, exposure to key contaminants can be characterized through the metabolic fingerprints approach. Further investigation of the metabolic pathways involved in this discrimination through metabolic networks quantitative modeling is expected to help gain a better understanding of the mechanisms involved in contaminants toxicity.

Acknowledgements: INRA teams thank the support of the Agence Nationale de la Recherche (ANR projects “Contreperf” and “Nistec”); INRA and the TUFTS team acknowledge the support of NIEHS grants (ES08314 and RC2ES018822). INRA and IRSET acknowledge the support of the EHESP-School of Public Health (Programme "jeunes chercheurs") and the French Ministry of Environment (Grenelle de l'Environnement, programme LOLF 189 EXPiOmark).

References:

1. Cabaton NJ, Canlet C, Wadia PR, Tremblay-Franco M, Gautier R, Molina J, Sonnenschein C, Cravedi JP, Rubin BS, Soto AM, Zalko D. (2013). *Environ Health Perspect.* 586-93.
2. Bonvallot N, Tremblay-Franco M, Chevrier C, Canlet C, Warembourg C, Cravedi JP, Cordier C. (2013). *PLoS One.* 8(5).
3. Wold S, Antti H, Lindgren F, Ohman J. (1998); Chemometr Intell Lab 44:175-185.
4. McCombie G, Browning LM, Titman CM, Song M, Shockcor J, Jebb SA, Griffin JL. (2009). Metabolomics 5:363-74.
5. Jourdan F, Cottret L, Huc L, Wildridge D, Scheltema R, Hillenweck A, Barrett MP, Zalko D, Watson DG, Debrauwer L. (2010). Metabolomics. 6(2):312-321.
6. Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR Jr, Lee DH, Shioda T, Soto AM, vom Saal FS, Welshons WV, Zoeller RT, Myers JP. (2012); Endocr Rev. 33(3):378-455.
7. Alonso-Magdalena P, Morimoto S, Ripoll C, Fuentes E, Nadal A. (2006). Environ Health Perspect 114:106-112.
8. Alonso-Magdalena P, Vieira E, Soriano S, Menes L, Burks D, Quesada I, Nadal A. (2010). Environ Health Perspect. 118:1243-50.
9. Newbold RR, Padilla-Banks E, Jefferson WN. Mol Cell Endocrinol. (2009). 25;304:84-9.

NOUVELLES APPROCHES POUR APPREHENDER L'EXPOSITION AUX PESTICIDES EN MELANGE ET LEURS EFFETS BIOLOGIQUES

Jean-Pierre Cravedi (1), Nathalie Bonvallot (1,2,3), Amélie Crépet (4), Jean-Charles Leblanc (4), Vanessa Graillot (1,4), Marc Audebert (1), Emilien Jamin (1), Marie Tremblay-Franco (1), Cécile Canlet (1), Sylvaine Cordier (3), Cécile Chevrier (3), Laurence Payrastre (1), Laurent Debrauwer (1).

(1) INRA, UMR1331, Toxalim, Toulouse – jcravedi@toulouse.inra.fr ; (2) EHESP, Rennes ; (3) INSERM UMR 1085 IRSET, Rennes ; (4) ANSES, Direction de l'Evaluation des Risques, Maisons Alfort.

L'exposition de la population générale aux pesticides est généralement évaluée par des méthodes indirectes qui consistent à croiser des données de contamination alimentaires avec celles des habitudes de consommation de la population. A partir de ces jeux de données et en utilisant des méthodes statistiques de classification il est possible d'estimer les pesticides auxquels les consommateurs sont exposés, les niveaux d'exposition ainsi que les principaux aliments vecteurs. C'était un des objectifs du projet ANR « PERICLES » qui visait à caractériser l'exposition de la population française aux cocktails de pesticides, puis d'étudier, dans un second temps, les effets toxiques des mélanges comparés à ceux de chacun des constituants pris individuellement. Ces travaux ont permis d'une part d'identifier sept cocktails contenant 2 à 6 pesticides auxquels la population française est majoritairement exposée et d'autre part de mettre en évidence une grande variabilité des modèles cellulaires utilisés pour estimer la toxicité de ces mélanges. Au final peu de mélanges font apparaitre une toxicité plus élevée que celle prédite par l'additivité des réponses.

Si cette approche permet de caractériser l'exposition aux résidus de pesticides *via* l'alimentation et de mettre en évidence d'éventuels effets cocktails, elle ne tient pas compte des autres voies d'exposition telle que l'inhalation ou éventuellement le contact avec la peau. Les programmes de bio-surveillance sont un autre moyen de rendre compte de l'exposition aux pesticides. Les analyses de sérum, de plasma ou d'urine sont fréquemment utilisées pour estimer l'exposition professionnelle ou de la population générale aux pesticides. Néanmoins ces analyses sont longues et coûteuses et rares sont celles, multirésidus qui couvrent d'autres familles de produits que les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates ou les pyréthrinoïdes.

De façon plus récente, l'UMR1331 INRA/INP/UPS Toxalim de Toulouse a développé une démarche non ciblée basée sur une méthode séparative, la chromatographie en phase liquide à ultra-haute performance, couplée à la spectrométrie de masse haute résolution. Cette méthode a été appliquée à l'analyse des métabolites de pesticides sur des échantillons d'urine collectés sur des femmes enceintes de la région Bretagne (cohorte Pélagie). Dans un premier temps une liste de 47 pesticides a été élaborée à partir des données de pratiques agricoles correspondant aux lieux d'habitation des femmes au moment du recueil urinaire, d'une part, et des recommandations d'usage des produits phytosanitaires des chambres d'agriculture et de l'index phytosanitaire publié par l'ACTA, d'autre part. Dans un second temps, les métabolites correspondant à la liste de pesticides choisis ont été recherchés dans les données produites à partir de l'analyse des échantillons urinaires (378 métabolites). La démarche repose sur l'identification de signaux spécifiques à un pesticide ou ses métabolites sur la base de sa masse exacte, et sur une confirmation des structures chimiques par comparaison avec des standards, lorsqu'ils existent, ou des produits de biotransformation isolés à partir d'expérimentations animales complémentaires. Le signal d'une substance détectée par spectrométrie de masse étant proportionnel à sa concentration, la méthode globale est qualifiée de semi-quantitative. Elle discrimine des groupes d'exposition en fonction de la surface consacrée à la culture céréalière à proximité du lieu de résidence des individus. Les données obtenues indiquent que

ce sont majoritairement les métabolites de deux pesticides, l'azoxystrobine et le fenpropimorphe, qui permettent de discriminer ces groupes d'exposition.

Sur des échantillons d'urine provenant de la même cohorte, il a été procédé à une analyse métabolomique afin d'appréhender l'incidence d'une exposition à un mélange complexe de pesticides sur le métabolome (ensemble des métabolites présents dans l'échantillon). Les analyses ont été effectuées en RMN et les données ont été traitées par régression des moindres carrés partiels (PLS-DA). Les groupes d'exposition préalablement constitués à partir des cultures céréalières ont pu être discriminés par cette approche. Cette discrimination repose principalement sur des métabolites tels que la glycine, la thréonine, la glycérophosphocholine, ou encore les acides lactique et citrique. Ces résultats suggèrent que l'exposition à des mélanges complexes de pesticides à faibles doses est susceptible d'avoir un impact sur les voies métaboliques de l'organisme en affectant le métabolisme énergétique et le stress oxydant.

Une expérimentation animale a été mise en place pour tenter de reproduire les effets métaboliques de ces mélanges complexes chez des rates gravides exposées pendant la gestation et analyser si le métabolisme des fœtus est également affecté par l'exposition de la mère. Les résultats préliminaires obtenus chez ces animaux, à partir de plusieurs types d'échantillons biologiques, confirment la sensibilité de cette approche et sa capacité à discriminer des lots d'individus en fonction du niveau ou du profil d'exposition. Ils indiquent en outre que ces signatures biologiques peuvent apparaitre à des stades très précoces de développement.

D'autres travaux menés dans l'UMR Toxalim se sont orientés vers des approches métabolomiques visant des mélanges plus simples. Du chlorpyrifos, de l'atrazine et de l'endosulfan, seuls ou en mélange, ont été incorporés à faible dose à de l'aliment distribué à des souris, depuis l'accouplement jusqu'au sevrage des souriceaux. Ces derniers ont été ensuite nourris avec l'aliment reçu par leur mère pendant une période additionnelle de 11 semaines. L'analyse métabolomique des plasmas d'adultes a mis en évidence des différences entre mâles et femelles. Indépendamment du sexe, l'empreinte métabolique obtenue suite à l'exposition alimentaire aux pesticides en mélange est différente de celle observée chez les animaux consommant l'aliment contaminé par chacun des pesticides, ces derniers étant eux-mêmes différents de ceux non exposés aux pesticides. Les perturbations métaboliques entre les différents groupes animaux sont perceptibles dès le sevrage.

L'ensemble de ces résultats montre que des approches globales, non ciblées, peuvent permettre non seulement de qualifier une exposition à des mélanges complexes de pesticides à faible doses, mais également de discriminer des populations en fonction du niveau d'exposition. Les modifications subtiles du métabolisme, si elles ne peuvent être considérées, a priori, comme des effets néfastes, indiquent néanmoins que des voies métaboliques peuvent être modifiées par une exposition à des pesticides à des doses présentes dans l'environnement et/ou l'alimentation. L'interprétation de ces données reste un champ d'investigation encore peu couvert par la toxicologie.

Mots-clés : pesticides_mélanges_exposition_toxicité_métabolomique

Métabolomique semi-ciblée par LC-HRMS de métabolites de pesticides dans des urines : vers une caractérisation de l'exposition humaine ?

Emilien Jamin[1], Marion Gaudicheau[1], Nathalie Bonvallot[1,2,3], Marie Tremblay-Franco[1], Jean-Pierre Cravedi[1], Cécile Chevrier[3], Sylvaine Cordier[3], Laurent Debrauwer[1]

1 INRA, UMR1331, Toxalim, Research Centre in Food Toxicology, Toulouse, France

2 EHESP – School of public health, Rennes – Sorbonne Paris Cité, France

3 INSERM UMR 1085 IRSET – Institut de recherche en santé, environnement, travail, Rennes, France

jamin@toulouse.inra.fr

L'évaluation de l'exposition aux pesticides reste un défi important dans la mesure où les volumes d'échantillons disponibles à partir de cohortes sont souvent faibles et où la recherche de composés présents doit être la plus exhaustive possible. De plus, dans le cas d'échantillons urinaires, les pesticides potentiellement présents le sont généralement sous forme de métabolites, dont les structures ne sont pas forcément connues à priori. Dans ce contexte, ce travail a consisté à évaluer le potentiel d'une approche semi-ciblée par UHPLC-HRMS pour la recherche de métabolites de pesticides dans des échantillons urinaires issus de lacohorte PELAGIE (Perturbateurs Endocriniens Etude Longitudinale sur les Anomalies de la Grossesse, l'Infertilité et l'Enfance). L'étude PELAGIE conduite par l'INSERM, consiste à évaluer les conséquences des expositions à divers contaminants, en particulier les pesticides, à partir d'une cohorte de 3421 femmes enceintes de la région Bretagne afin d'évaluer l'influence de cette exposition sur le déroulement de la grossesse, son issue et sur le développement psychomoteur de l'enfant.

Dans ce travail, 40 échantillons ont été tirés au sort parmi les quatre groupes d'individus plus ou moins exposés aux pesticides selon leur environnement : population urbaine / population rurale plus ou moins entourée de cultures céréalières. Ces échantillons ont été directement analysés par UHPLC-HRMS (phase stationnaire C18, ionisation Electrospray en mode positif et négatif, spectromètre de masse LTQ-Orbitrap). Les données obtenues ont été analysées à l'aide du logiciel MetWorks (Thermo Scientific) afin d'extraire et d'intégrer les signaux correspondant à 47 pesticides et leurs métabolites connus ou théoriques, soit environ 450 molécules au total. L'intérêt de cette approche semi-ciblée vient du fait que l'acquisition des données est réalisée de manière globale (full HRMS) et qu'il est donc possible a posteriori de rechercher des pesticides ou leurs métabolites non sélectionnés initialement. Tous les signaux détectés ont été analysés par des expériences MS^n afin d'étayer les hypothèses d'identification des métabolites détectés. Certains d'entre eux ont pu être confirmés par comparaison avec des métabolites issus d'une expérimentation animale conduite en parallèle.

24 variables ont ainsi pu être détectées en mode négatif et ensuite analysées par PLS-DA. Les résultats obtenus en mode positif n'ont pas apporté d'informations supplémentaires. Les résultats obtenus après filtrage OSC des données générées en mode négatif, montrent qu'une meilleure séparation des groupes d'exposition est obtenue à partir de données normalisées à l'aide d'un étalon interne. Les groupes ont ainsi été séparés grâce à 6 variables correspondant à 3 pesticides dont 2 fongicides utilisés en culture céréalière.

En conclusion, la méthode semi-ciblée développée a permis de distinguer plusieurs groupes de sujets de la cohorte sur la base de leur exposition aux pesticides, caractérisée sur la base de plusieurs métabolites. L'acquisition des signaux initiaux permet de disposer d'un jeu de données complet servant de base pour construire les expériences de MS/MS ciblées visant à l'identification structurale des métabolites détectés en première intention.

How far can we trust untargeted exposomics : significance and limits of an exploratory study on urinary pesticide metabolite screening for human exposure evaluation

Laurent Debrauwer[1,2], Emilien Jamin[1,2], Nathalie Bonvallot[1,2,3,4], Marie Tremblay-Franco[1,2], Sylvaine Cordier[4], Cécile Chevrier[4]and Jean-Pierre Cravedi[1,2]

1 INRA, UMR1331, Toxalim, Research Centre in Food Toxicology, Toulouse, France
2 Toulouse University, INP, UMR1331, Toxalim, Toulouse, France
3 EHESP – School of public health, Rennes – Sorbonne Paris Cité, France
4 INSERM UMR 1085 IRSET – Institut de recherche en santé, environnement, travail, Rennes, France

Overview

- Risk assessment related to exposure to chemical cocktails is of growing concern and requires powerful exposure assessment methods.
- Urinary metabolites represent reliable exposure indicators but may not be included in multi-residue methods (unknown / unavailable compounds).
- Complementary to targeted multi-residue analysis methods, untargeted UHPLC-HRMS approaches can provide extended information on multi-exposure.

Introduction

An exploratory study based on a prospective population-based cohort in France - the PELAGIE cohort – has been conducted from collected urine samples of pregnant women with the aim to assess pesticide exposure biomarkers [1,2].

An untargeted exposomics workflow using UHPLC-HRMS has been developed to:

(i) characterize pesticides metabolites in urine samples
(ii) discriminate individuals based on their pesticide exposure profile
(iii) correlate exposomics profiles with the pesticides impregnation

Conclusions

- Statistical models built from LC-HRMS data allowed the identification of 2 fungicides used for cereals cultures and discriminating women groups (in agreement with agricultural uses and environmental data)
- The untargeted acquisition method developed herein allowed evidencing urinary metabolites resulting from pesticide exposure. Their structural identification is challenging.
- Although based on an upgradable list of screened metabolites without need for sample re-analysis, the method is at best semi-quantitative and not fully without a priori yet.
- Some metabolites may be missed due to matrix effects. However, the inclusion of several metabolites for one pesticide in the screened list increases likelihood to evidence exposure to given pesticides.

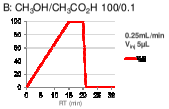
Sample selection and analysis

- Mass spectrometry analyses carried out on 40 urine samples randomly selected within 4 groups (10 samples / group) of subjects: urban population versus rural population surrounded by different cereal cultures environments [1].

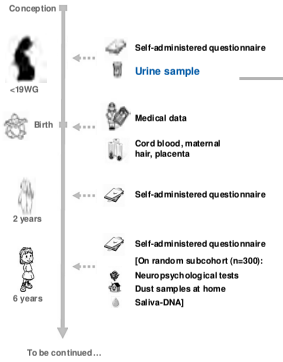
- HRMS conditions
  LTQ-Orbitrap XL (Thermo Scientific)

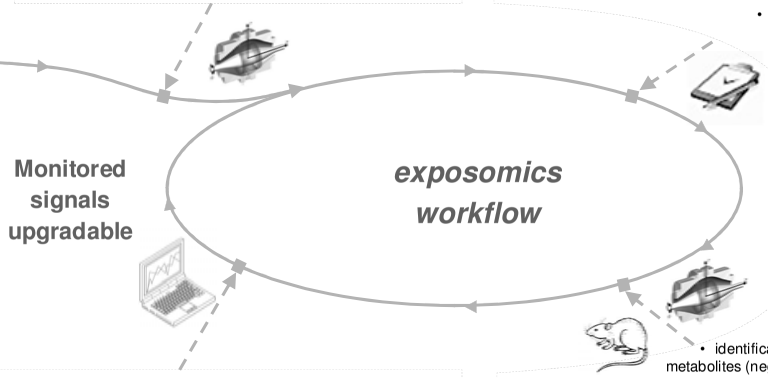
  Resolution 30000
  dependent scan
  ESI positive mode
  ESI negative mode

- UHPLC conditions
  Hypersil GOLD C18 (100x2.1mm) 1.9µm
  A: $H_2O/CH_3OH/CH_3CO_2H$ 95/5/0.1
  B: CH_3OH/CH_3CO_2H 100/0.1



- Analytical method
  Samples : *n*=40 diluted twice in mobile phase A
  Blank samples injected alongthe analytical sequence
  QC samples: Spiked urine samples (Ethephon at 5 concentrations analyzed in triplicate along the analytical sequence
  ☑ no carry-over
  ☑ no signal variability
  ☑ no RT variability





Screening of potential metabolites

- List of 47 pesticides established based on:
  - agricultural practices in Brittany between 2000 and 2005
  [*AGRESTE, French Ministry of Agricultural and Fishing*] : wheat, corn, canola, peas, vegetable crops.
  - study of the uses of pesticides on cereals in Brittany
  [*CORPEP, Cell Guidance for Regional Protection of Waters against Pesticides*]
  - study of contamination of rivers in areas of vegetable crops in Brittany
  [*DIREN, Regional Directorate of Environment*]
  - study of the uses of pesticides on peas
  [*ACTA, network of institutes of animal and plant sectors*]

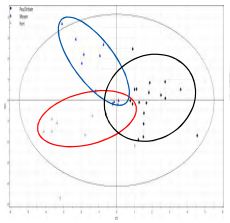
Acephate	Dichlorvos	Naled
Anthraquinone	Dimethachlor	Napropamide
Azinphos-methyl	Epoxiconazole	Omethoate
Azoxystrobin	Ethephon	Oxydemeton-methyl
Benfuracarb	Fenitrothion	Paclobutrazol
Carbendazim	Fenpropimorph	Pencycuron
Carbofuran	Glyphosate	Permethrin
Carbosulfan	Imidacloprid	Phosalone
Chlormequat	Iprodione	Procymidone
Chlorothalonil	Kresoxim-methyl	Propachlor
Chlorpropham	Lambda-cyhalothrin	Pirimicarb
Chlorpyrifos	Linuron	Quizalofop-ethyl
Clomazone	Malathion	Tebuconazole
Cymoxanil	Metazachlor	Thiophanate-methyl
Cypermethrin	Metconazole	Trifluralin
Deltamethrin	Methidathion	

- Initial list of metabolites
  Bibliography on selected pesticides + theoretical phase II metabolites
  → 386 metabolites
- LC-HRMS data analysis
  MetWorks 1.3
  433 signals monitored
  (pesticides + metabolites) at *m/z* ± 5ppm using MetWorks (Thermo Scientific).

Statistics

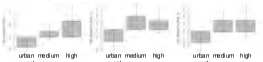
OSC PLS-DA on the relative areas of the 24 identified metabolites using Ethephon as internal standard.

- Second model built on 3 groups.
  "urban" & "weak" associated

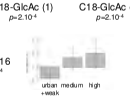


  urban & weak
  medium
  high
  R^2 53,5%
  Q^2 0,375

  Kruskal-Wallis:
  Azoxystrobin:

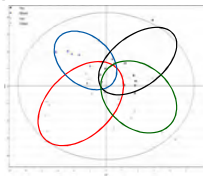


  Fenpropimorph:



- First model with the 4 groups of individuals surrounded by different cereal culture environments.

  urban
  weak
  medium
  high



  R^2 46,4%
  Q^2 0,289

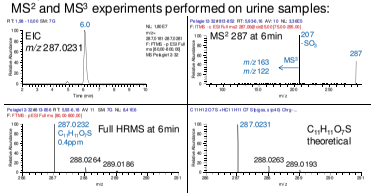
  "urban" & "weak" profiles very close likely due to the small size of the cities studied.

- identification of 24 metabolites (negative ESI)

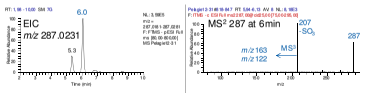
Name	Pesticide	Identification level [3]
C18-SO_3H	Azoxystrobin	1
C18-GlcAc (1)	Azoxystrobin	1
C18-GlcAc (2)	Azoxystrobin	1
BF421-16	Fenpropimorph	1
BF421-16-SO_3H	Fenpropimorph	1
BF421-16-GlcAc	Fenpropimorph	1
BF421-16-OH (1)	Fenpropimorph	3
BF421-16-OH (2)	Fenpropimorph	3
BF421-17	Fenpropimorph	1
BF421-17-SO_3H	Fenpropimorph	1
BF421-17-GlcAc	Fenpropimorph	1
BF421-3-GlcAc	Fenpropimorph	3
3-Me-4-Nitrophenol-SO_3H	Fenitrothion	1
M3	Procymidone	1
PPA	Quizalofop-*p*-ethyl	1
PPA-GlcAc (1)	Quizalofop-*p*-ethyl	1
PPA-SO_3H (1)	Quizalofop-*p*-ethyl	1
PPA-SO_3H (2)	Quizalofop-*p*-ethyl	1
*p*OH-Chlorpropham-SO_3H	Chlorpropham	1
*p*OH-Chlorpropham-GlcAc	Chlorpropham	1
3OH-CFP-SO_3H	Carbofuran	1
3OH-CFP-GlcAc	Carbofuran	1
3keto-CFP	Carbofuran	1
3keto-CFP-GlcAc	Carbofuran	1

Metabolites identification

- Example of C18-SO_3H (a metabolite of *Azoxystrobin*)
  high resolution mass measurement, isotopic pattern interpretation,
  MS^2 and MS^3 experiments performed on urine samples:



  Confirmation:
  Analyses of rat urine exposed (gavage) to the 7 suspected pesticides (200µg of each) collected 24h, 48h and 72h. C18-SO_3H detected at the same RT, and displaying similar MS^2 and MS^3 spectra:



Acknowledgments:
Authors would like to thank Marion GAUDICHEAU (EIP, Toulouse, France) who performed LC-HRMS profiling, Elisabeth JEUNESSE and Florence BLAS-Y-ESTRADA (INRA Toxalim, Toulouse, France) for animals experiments.

References:
[1] C. Petit *et al.*, *Environmental Health* 9 (2010) 71-83
[2] C. Chevrier *et al.*, *Environmental Health Perspectives* 119 (2011) 1034-1041
[3] L.W. Sumner *et al.*, *Metabolomics* 3 (2007) 211-221

Contact: laurent.debrauwer@toulouse.inra.fr URL: http://www.metatoul.fr/

TITRE : Application de la métabolomique à l'étude du lien entre les expositions environnementales aux pesticides pendant la grossesse et le développement de l'enfant : approches épidémiologique et toxicologique

Environmental exposure to pesticides is of growing interest in public health, especially in pregnant women. The combination of metabolomics analyses both in human and animal allows testing the utility of this tool in the study of complex mixtures and low-dose exposures. 1H NMR metabolic profiling was carried out on urinary samples collected at the first trimester of pregnancy and cord blood samples at birth for more than 300 women included in the PELAGIE cohort (Britany, France) and on urine, blood, liver and brain from rats and their fetuses orally exposed during the gestation to 8 pesticides representative of human exposures. Based on PLS-DA analyses, a good separation of the metabolic profiles was observed in human according to the percentage of area devoted to cereal crops in the town of residence. The metabolic modifications suggest an osmo-protective mechanism associated with an oxidative stress. Animal data confirmed this hypothesis with plasmatic, liver and brain metabolic changes suggesting a mitochondrial dysfunction. The associated health impacts are yet to be studied.

Auteur : NATHALIE BONVALLOT

Titre : Application de la métabolomique à l'étude du lien entre les expositions environnementales aux pesticides pendant la grossesse et le développement de l'enfant : approches épidémiologique et toxicologique

Directeurs de thèse : JEAN-PIERRE CRAVEDI et SYLVAINE CORDIER

Thèse soutenue à Toulouse le 13 juin 2014

Les expositions environnementales aux pesticides chez la femme enceinte sont une préoccupation de santé publique. L'association d'analyses métabolomiques par RMN chez l'Homme et l'animal a permis de tester l'utilité de cet outil dans l'étude des mélanges complexes. Les empreintes métaboliques proviennent des urines et du sang de cordon de plus de 300 femmes de la cohorte PELAGIE (Bretagne) et des urines, sang, foie et cerveaux de rates et de leurs fœtus exposés par voie orale durant la gestation à 8 pesticides représentatifs des expositions humaines. Une discrimination des profils métaboliques a été observée chez l'Homme en fonction de l'exposition estimée par la part de cultures de céréales dans la commune. Les modifications métaboliques suggèrent un mécanisme osmo-protecteur lié à un stress oxydant. Les données animales ont confirmé ces observations avec des modifications évoquant un dysfonctionnement mitochondrial. Les conséquences sanitaires associées restent à étudier.

Mots clés : Métabolomique, Santé-environnement, Mélanges, Pesticides.

Discipline : Pathologie, toxicologie, génétique et nutrition

Laboratoires :

INRA UMR 1331 TOXALIM, 180 chemin de Tournefeuille, 31027 Toulouse cedex 3

INSERM UMR 1085 IRSET, Avenue du professeur Léon Bernard, 35043 Rennes cedex