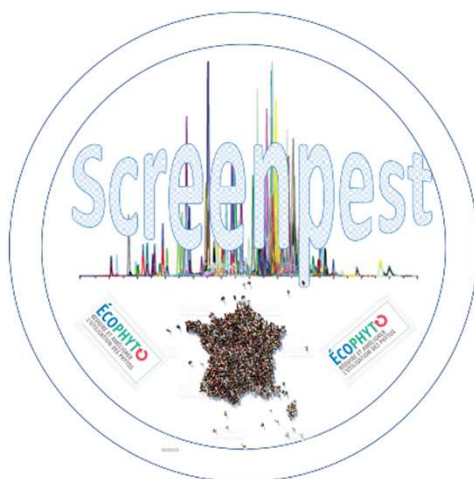
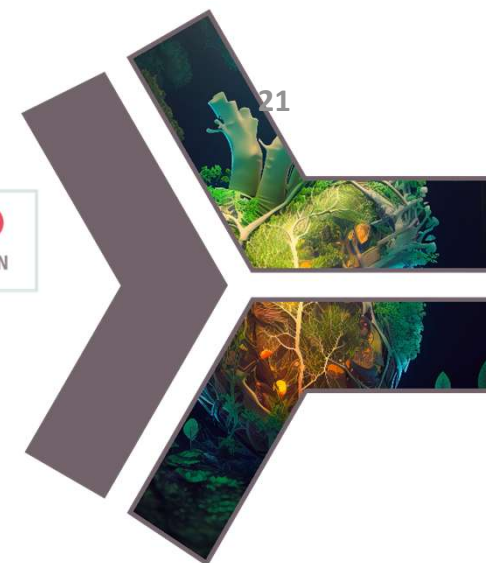




Carrefours de l'innovation INRAE
Agriculture / Alimentation / Environnement



ÉCOPHYTO
RECHERCHE & INNOVATION



SCREENPEST

Développement et mise en œuvre d'une nouvelle approche de criblage à large échelle pour une caractérisation étendue de l'exposition de l'Homme aux pesticides

- Laurent DEBRAUWER, INRAE Toxalim Toulouse



01. Contexte, objectifs et caractère novateur du projet par rapport aux enjeux Ecophyto 22



Evaluation précise et exhaustive de l'exposition des populations aux pesticides

Méthodes indirectes / exposition externe
(questionnaires, enquêtes de consommation, EATs)



Approches de biosurveillance
(approches ciblées / nb. limité de substances définies a priori)



Caractérisation des expositions incomplète
(complexité des co-expositions, volumes d'échantillons limités pour analyses multiples)

Besoin d'une nouvelle approche méthodologique de profilage non ciblé et sans à priori pour une couverture large de marqueurs d'exposition avec une prise d'échantillon la plus faible et la moins invasive possible

- Basée sur la spectrométrie de masse à haute résolution et les bases de données disponibles
- Exploitant des compétences et connaissances actuelles transdisciplinaires (chimie, épidémiologie, toxicologie)
- Visant à documenter la réalité des co-expositions aux pesticides pour deux sous-populations

02. Consortiums et partenaires du projet

INRAE

Toxalim
RESEARCH CENTRE IN FOOD TOXICOLOGY

P1 - INRAE TOXALIM

Oniris VetAgroBio Nantes
ÉCOLE NATIONALE INRAE

LABERCA

P2 - LABERCA-ONIRIS



LERES
ANALYSES - RECHERCHE

P3 - LERES-EHESP

Inserm

irset
Institut de recherche en santé,
environnement et travail

P4 - INSERM-IRSET

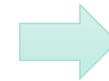
Inserm  INRAE

CRESS
Epidémiologie
Statistiques

P5 - CRESS-EREN-INRAE

03. Hypothèse(s) et méthodologie(s) mises en place

Phase 1: développement méthodologique et application à la caractérisation des expositions



Phase 2: étude du lien exposition-santé

Développement d'une méthodologie pour la caractérisation large échelle de l'exposition interne humaine aux pesticides via une démarche de profilage de suspects dans l'urine.



PELAGIE

- Cohorte mère-enfant (France, 2002-2006)
- Association entre l'exposition aux pesticides de femmes enceintes et les données biométriques à la naissance
- Accès à 168 échantillons

P4
irs

Pour accéder à cette grande variété de composés une nouvelle approche multiplexée de profilage utilisant plusieurs plateformes analytiques à partir d'un échantillon unique est requise.

NutriNet-Santé

- Population générale (France, depuis 2009)
- Association entre l'exposition aux pesticides et la survenue de diabète de type 2
- Accès à 200 échantillons

P5
RES
Epidémi
Stat

Développement d'un workflow analytique harmonisé en termes de préparation d'échantillon, mesure instrumentale et traitement de données.



P1



P2



P3

03. Hypothèse(s) et méthodologie(s) mises en place



Analyses ciblées et non-ciblées en spectrométrie de masse

Analyse ciblée

Voitures rouges



Analyse non ciblée

Toutes les voitures

Non détectée
Problème de la voiture blanche



Détectées

Détectée ?
Problème de la voiture rouge !



03. Hypothèse(s) et méthodologie(s) mises en place



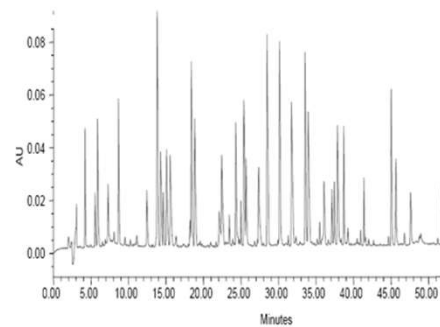
Principe général du profilage de suspect par HRMS

Matrices environnementales, alimentaires, humaines



Préparation d'échantillon non sélective

Profilage non-ciblé par chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS, GC-HRMS)



Génération non-sélective de descripteurs chimiques

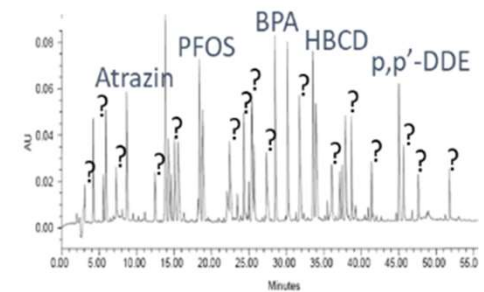


Annotation des descripteurs générés via la comparaison avec des données spectrales de référence

predefined list of suspect -> target markers

Accurate mass
Retention time
MS spectrum
MS/MS spectrum

Librairie de données MS/MS de référence (liste de suspects)



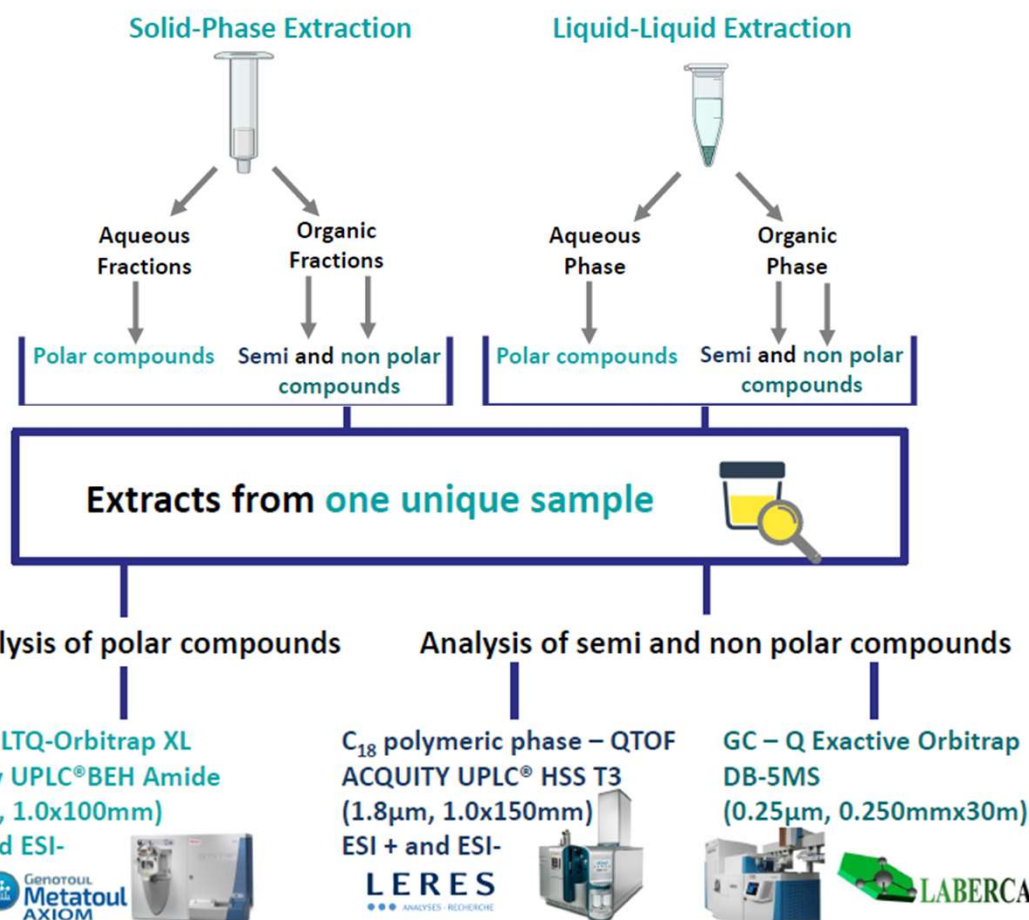
Annotation des marqueurs détectés

03. Hypothèse(s) et méthodologie(s)

Articulation et intégration méthodologique au service de la mutualisation des prélèvements et de la complémentarité entre partenaires



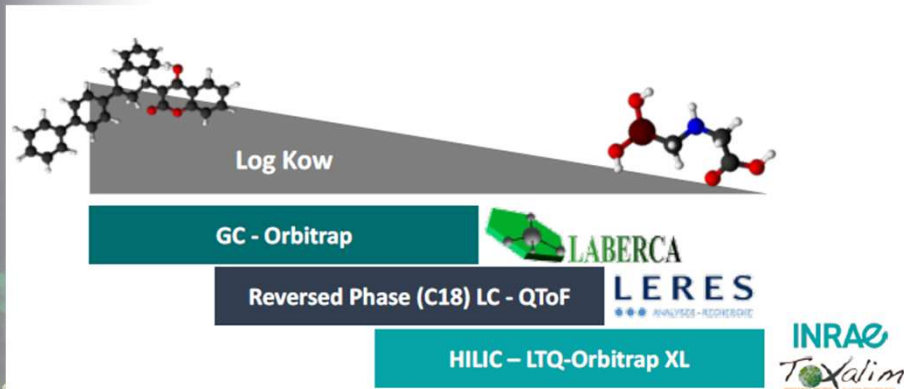
Performance comparison of two non discriminating extraction techniques (recovery and matrix effect)



04. Principaux résultats finaux

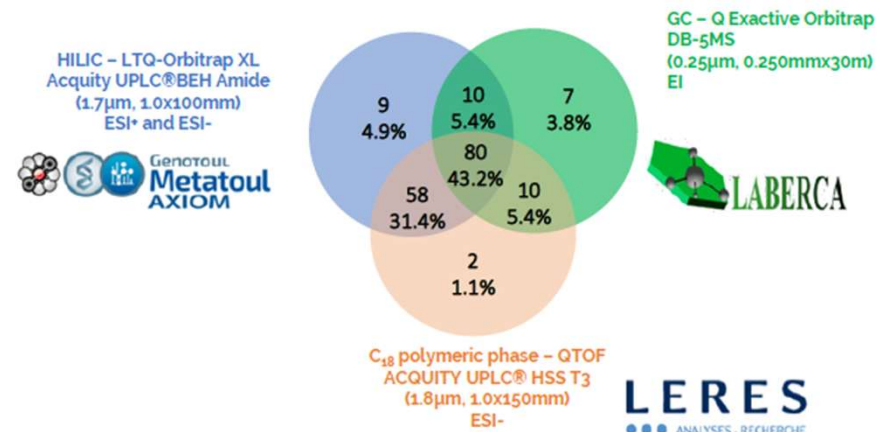
Démarche analytique innovante (amont) permettant à partir d'une prise d'échantillon minimale de couvrir un large espace chimique d'exposition aux pesticides sur une matrice non invasive (urine) en accédant aux métabolites non recherchés de façon systématique en analyse ciblée.

Couverture maximale de l'espace chimique par une approche multiplexée



Détection des composés sélectionnés dans la liste des suspects / développements (standards 10ng/ µL)

176 molécules détectées / 187 au total



04. Principaux résultats finaux

*Type de matrice de résultats de marqueurs d'exposition obtenus avec les 3 plateformes utilisées.
Avantages et limitations*

	1-Naphthyl acetamide		1-Naphthyl acetic acid		2,4-DB		2,4-Dichlorophenol		2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)		2-Amino-4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazine		2-diethylamino-6-methyl pyrimidin-4-ol	
	Relative intensity	Schymanski level	Relative intensity	Schymanski level	Relative intensity	Schymanski level	Relative intensity	Schymanski level	Relative intensity	Schymanski level	Relative intensity	Schymanski level	Relative intensity	Schymanski level
Ind IDXX 1	102589	1	10252	2a	52895	2a	4251843	1	552471	1	368051	2b	56824	1
Ind IDXX 2	...	1	...	2a	...	2a	...	1	...	1	...	2b	...	1
Ind IDXX 3														
Ind IDXX 4														
Ind IDXX 5														
Ind IDXX 6														
Ind IDXX 7														
Ind IDXX 8														
Ind IDXX 9														
Ind IDXX 10														
Ind IDXX 11														
Ind IDXX 12														
Ind IDXX 13														
Ind IDXX 14														
Ind IDXX 15														
Ind IDXX 16														
Ind IDXX 17														
Ind IDXX 18														
Ind IDXX 19														
Ind IDXX 20														
Ind IDXX 21														
Ind IDXX 22														
Ind IDXX 23														
Ind IDXX 24														
Ind IDXX 25														
Ind IDXX 26														

↑
 Comparaison possible
 inter-individus pour un
 même pesticide /
 métabolite
 (quantification relative)
 ↓

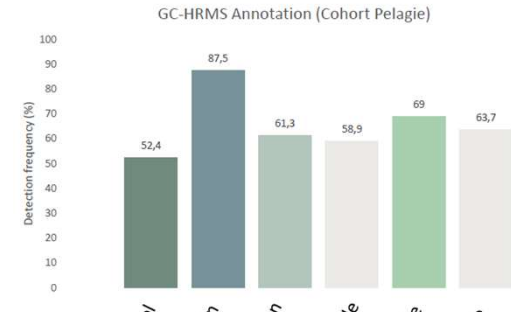
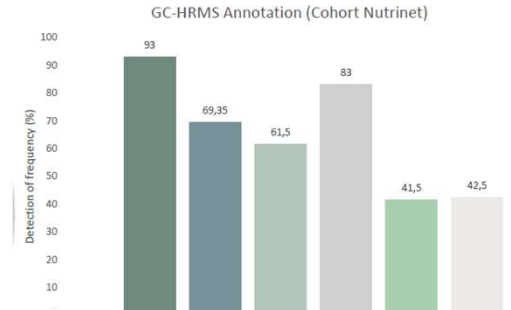
←
 Comparaison impossible entre pesticides /
 métabolites
 (facteurs de réponse, instrumentation)
 →

04. Principaux résultats finaux

Exemple de marqueurs associés à des taux de détection élevés

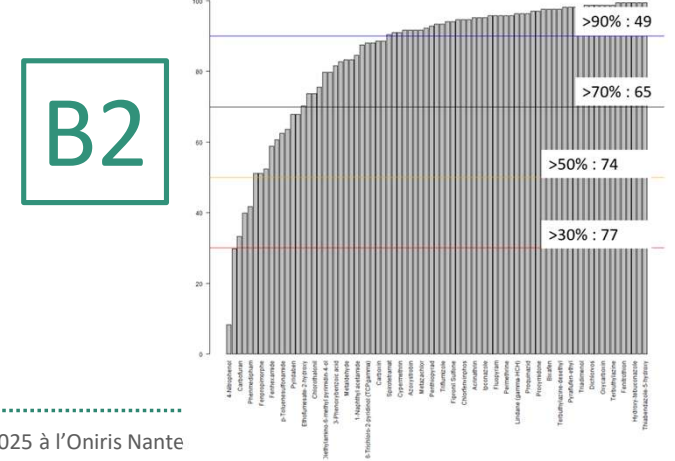
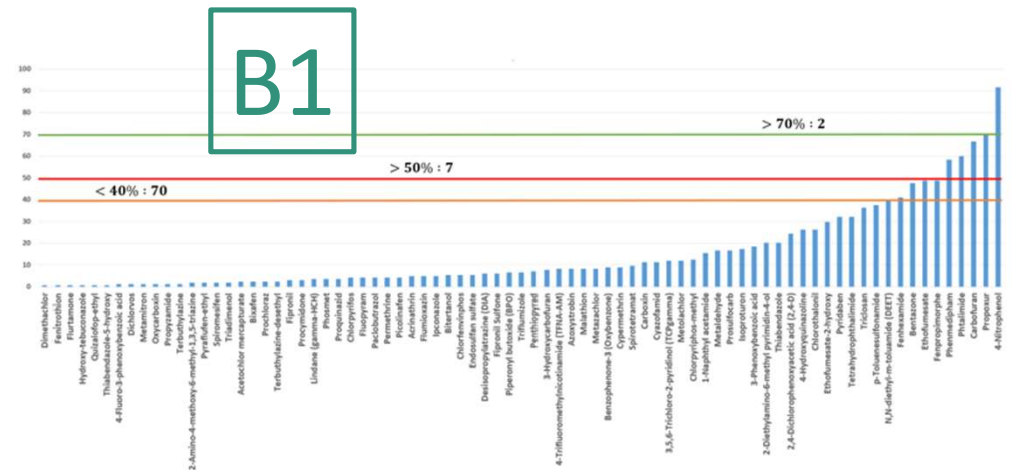
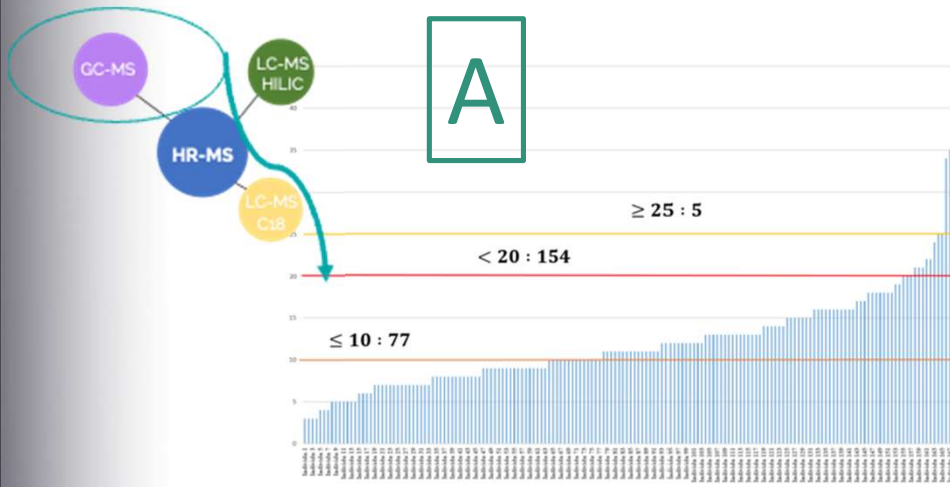
Exemple de liste de marqueurs d'exposition détectés générée par GC-HRMS

Marqueur	Variables d'identification
1,4-Dichlorobenzène	93
Carbofurane	69,35
Ethofumesate	61,5
Propoxur	83
Phthalimide	41,5
Bentazon	42,5



04. Principaux résultats finaux

Résultats en cours d'exploitation pour la relation exposition santé sur les deux cas d'étude retenus. Exemple de l'étude PELAGIE (168 échantillons, jeu de données d'apprentissage / matrice urinaire)



Données GC-HRMS : nombre de molécules détectées chez les différents sujets (A) et taux de détection des marqueurs d'exposition chez les sujets (B1-B2).

04. Principaux résultats finaux



Mise en évidence de nouveaux marqueurs d'exposition → information plus exhaustive



Métabolites (urine) peu considérés dans les études ciblées (manque de standards) mais présents dans les bases de données de suspects sur les approches non ciblées.

Etudes ciblées : 😊 ++ sensibilité / capacités quantitatives



-- nbre de composés considérés / manque de composés standards

Etudes non ciblées : 😊 ++ nbre de suspects quasi-illimité (databases) et retour sur les données



-- Capacités quantification absolue (sensibilité s'approchant des approches ciblées)

Etude Pelagie (168 éch.) → lien exposition mère aux PP / paramètres anthropométriques de l'enfant

Etude Nutrinet (200 éch.) → survenue diabète T2 suite à exposition aux pesticides



++ Résultats préliminaires très encourageants



++/-- Travail de longue haleine/données MS massives/outils statistiques.

05. Transfert & valorisation de ces résultats

Résultats analytiques innovants communiqués sur une large communauté spécialisée (niche de communication étroite)

Valorisation : développement technologique innovant pour la communauté exposome

Résultats en cours d'exploitation → nouveaux marqueurs d'exposition non considérés dans les études ciblées.

Transfert de ces approches vers les laboratoires publics / privés → extension à d'autres matrices (sanguine, capillaire, bracelets silicone...)

Capitalisation des développements conduits dans le cadre de l'infrastructure de recherche nationale France-Exposome



4 actions de formation (Ecole chercheur, formation initiale M1/M2)

16 Communications congrès (oral / poster)

Publications en cours de rédaction



Transfert nouveau paradigme

Verrou : instrumentation et compétences spécifiques




Actuellement disponibles quasi-uniquement dans les laboratoires de recherche

07. Perspectives issues du projets

Enseignements issus du projet

-  - Méthodologie analytique non ciblée innovante (préparation d'échantillon harmonisée/analyse HRMS multiplexée → extension à d'autres matrices biologiques.
-  - Preuve de concept sur la plus-value de l'approche proposée par rapport aux approches ciblées classiquement utilisées à ce jour.

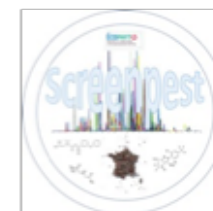
Nouvelles questions scientifiques / nouveaux besoins de recherche

-  - Renforcer le traitement de données HRMS pour l'annotation / identification de suspects (en cours : projet PARC et infrastructures MetaboHUB et FR Exposome)
-  - Pertinence toxicologique des marqueurs détectés. Interconnexion avec les databases toxicologiques (e.g. EPA CompTox, NIH ToxNet...), la plus automatisée possible
-  - Adaptation/sophistication des modèles statistiques utilisés en épidémiologie pour une exploitation optimale des données HRMS (taille/dimension matrices de données)

Remerciements



MERCI POUR VOTRE ATTENTION



P1



E. Jamin
E. Mirmont*
H. Zhou

P5



E. Kesse-Guyot
J. Baudry

P4



N. Costet
N. Ayeva*
C. Chevrier



Un grand merci à nos joyeux post-docs !

P3



A. David
F.Z. Alem*
J. Chaker

P2



J.P. Antignac
F. Vela-Soria
T. Moufawad*
E. Bichon
I. Guiffard

* Personnel financé par le projet Screenpest

Projet financé par l'OFB (appel à projets de recherche innovation Plan Écophyto II+, Contrat OFB 20.0743).