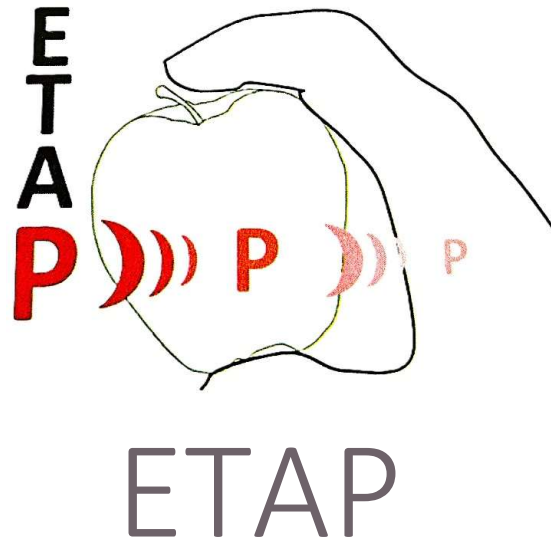
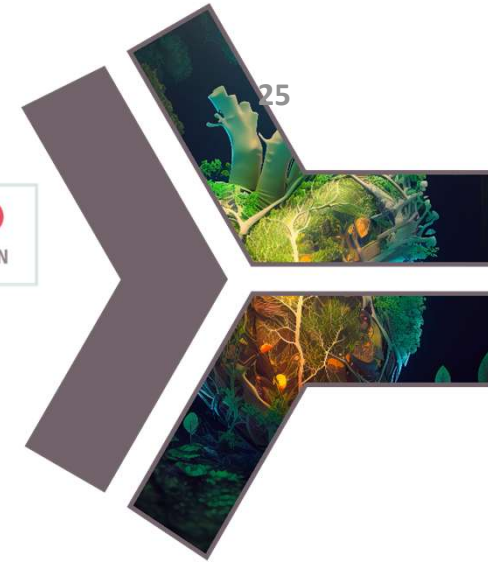




Carrefours de l'innovation INRAE
Agriculture / Alimentation / Environnement



ÉCOPHYTO
RECHERCHE & INNOVATION

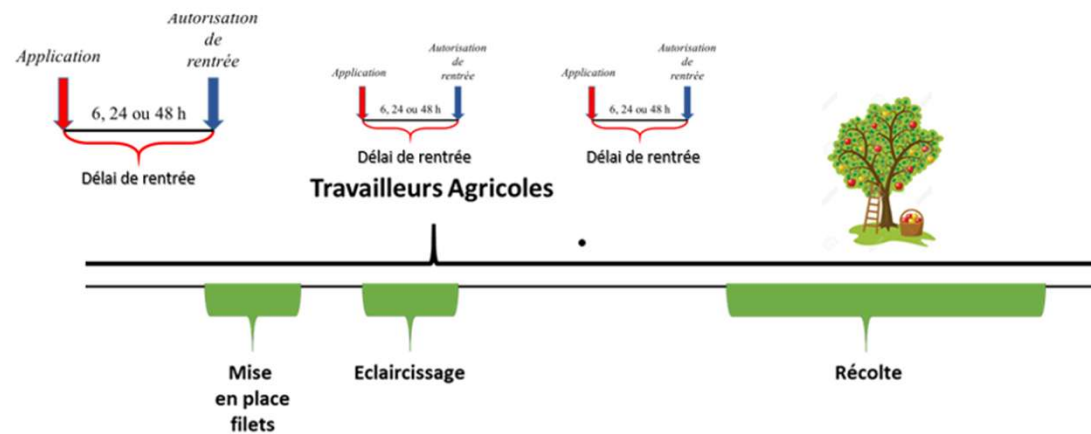


Exposition des Travailleurs Agricoles aux Produits phytopharmaceutiques en Vergers de Pommiers : De la contamination à l'impact endocrinien

- Sonia Grimbuhler, INRAE UMR ITAP Montpellier



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



Travailleurs Agricoles possiblement exposés ?

Objectifs :

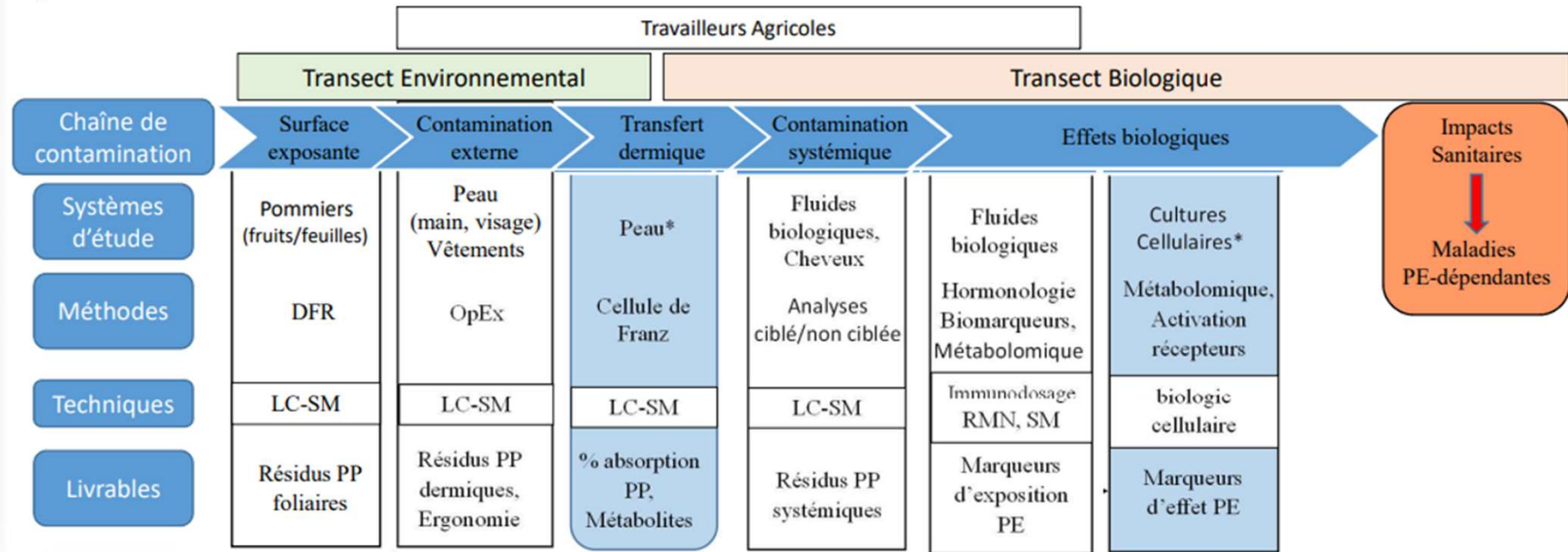
- ✓ Déterminer l'**exposition** « Pesticides » des Travailleurs Agricoles, en suivant la chaîne de contamination, du végétal à leur contamination systémique ;
- ✓ Déterminer si cette exposition* peut impacter la santé des TA par un *effet perturbateur endocrinien*.

* *A priori*, exposition à de **faibles doses** mais avec des **mélanges** et sur une **longue période**

02. Consortium et partenaires du projet



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



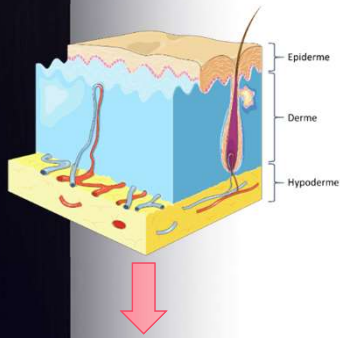
- Caractérisation des expositions des arboriculteurs selon les activités
- Détermination de l'absorption dermique des pp exposant les TA
- Caractérisation des effets des pesticides à faibles doses en mélange
- Arboriculteurs acteurs de leur sécurité : comment réduire les expositions ?



04. Principaux résultats

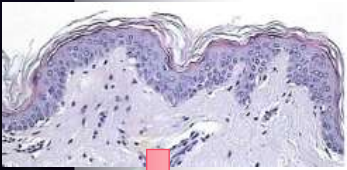
Tâche 2.1 Transfert dermique des PP (P1) : Évaluer *in vitro* le passage transcutané et le métabolisme de PP radiomarqués

Étude de passage transcutané avec approche compartimentale



Passage transcutané : processus de transport à travers la peau jusqu'à la circulation systémique d'une substance appliquée de manière topique

- Dépend de nombreux facteurs : propriétés physico-chimiques de la molécule, état physiologique de la peau, etc.



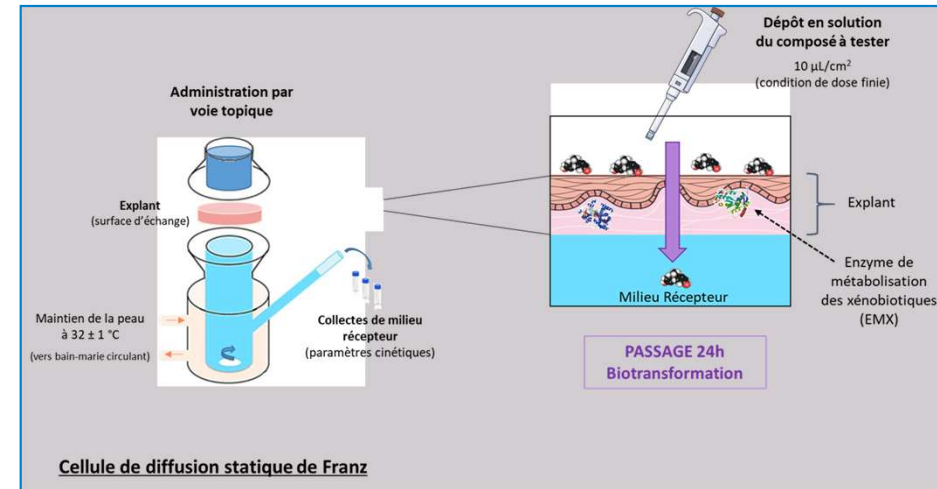
Études sur peau humaines viables

Biopsies peaux humaines viables : issues d'opérations de chirurgie esthétique abdominales

Capacités de métabolisation cutanées conservées : enzymes du métabolisme des xénobiotiques (EMX) :

Phase I (CYPs, estérases, époxydes hydrolases)

Phase II (transférases, réactions de conjugaison)



Lignes directrices internationales : OCDE TG 428 (2004), OCDE Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies (2004), OCDE Guidance notes on dermal absorption (2011), EFSA Guidance on dermal absorption (2017), WHO Dermal Absorption Environmental Health Criteria 235 (2006)

- Optimisation du système → fonctionnel 😊
- pas de peau (pot 😞) en Janvier : 1 seul explant prévu mais annulation de l'intervention chirurgicale au dernier moment
- Nouveaux explants à venir → finaliser le travail sur Captan (THPI) en priorité.

04. Principaux résultats

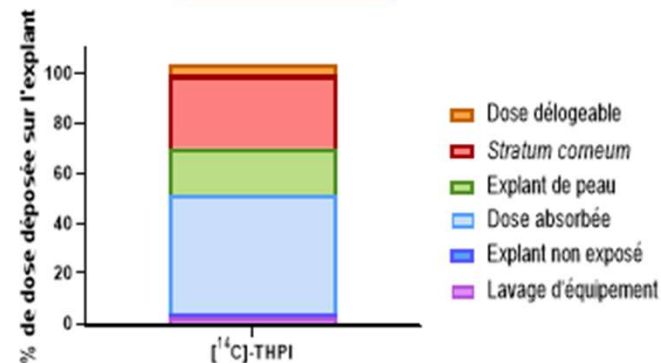
Tâche 2.1 Transfert dermique des PP (P1)

Évaluer *in vitro* le passage transcutané et le métabolisme de PP radiomarqués

Pilote de passage du [¹⁴ C]-THPI sur la peau humaine fraîche	
	Pourcentage de la dose appliquée
Dose délogeable	4,2
Stratum corneum dont couches 1-2	29
Explant de peau	19
Dose absorbée	47
Explant non exposé	1,7
Lavage de l'équipement	2,3
Dermal delivery	66
Bilan massique (%)	103

Dose délogeable - frottis de surface;
Dose absorbée - milieu récepteur + lavages de cellule;
Dermal delivery - dose absorbée + explant de peau;

Premiers résultats



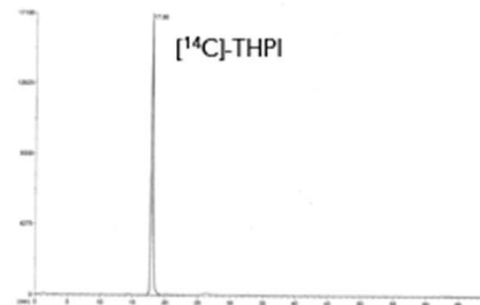
Bilans massiques du passage transcutané du [¹⁴C]-THPI (1,6 µg/explant)

Système

Radioactivité récupérée à 24h
 Biopsie humaine fraîche : femme de 45 ans
 Délai opération - dépôt* : 15h
 Molécule d'étude : [¹⁴C]-THPI
 Véhicule de dépôt : Acétone
 Contrôle positif : [¹⁴C]-7-hydroxycoumarine
 Q-té de radioactivité : ~ 1 300 000 dpm/expl

* - entre la fin de l'opération et le dépôt de la molécule, la peau a été conservée à 4 °C

➤ Profilage du milieu récepteur 24h après exposition à du [¹⁴C]-THPI par radio-HPLC :



Radio-chromatogramme du milieu récepteur 24 h après exposition d'un explant de peau humaine à du [¹⁴C]-THPI.

04. Principaux résultats

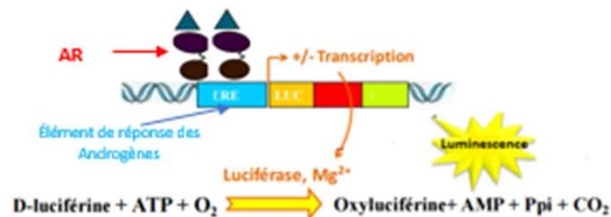
Tâche 2.4 Impact cellulaires endocriniens

Évaluer *in vitro* les activités endocriniennes des PP sur des modèles cellulaires humains bioluminescents

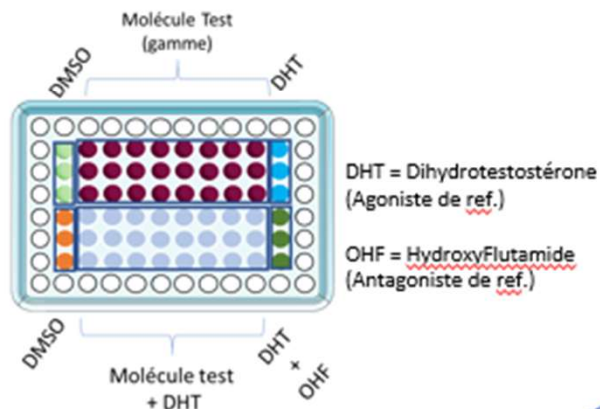
Lignée MDA-kb2

Transfectée avec le Récepteur aux Androgènes et le gène de la luciférase

Effet androgénique / anti-androgénique



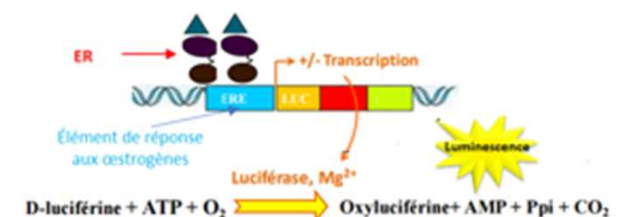
Détection d'un effet Androgénique ou Anti-androgénique



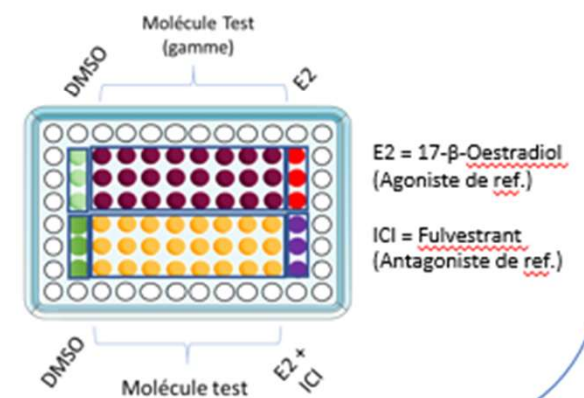
Lignée MELN

Transfectée avec le Récepteur aux oestrogènes et le gène de la luciférase

Effet oestrogénique / anti-oestrogénique



Détection d'un effet estrogénique ou Anti-estrogénique



04. Principaux résultats

Tâche 2.4 Impact cellulaires endocriniens

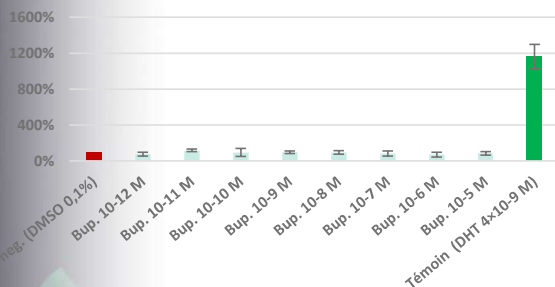
Évaluer *in vitro* les activités endocriniennes des PP sur des modèles cellulaires humains bioluminescents

Lignée MELN → Test de réponse à l'agoniste (E2) et à l'antagoniste de référence (ICI) en cours

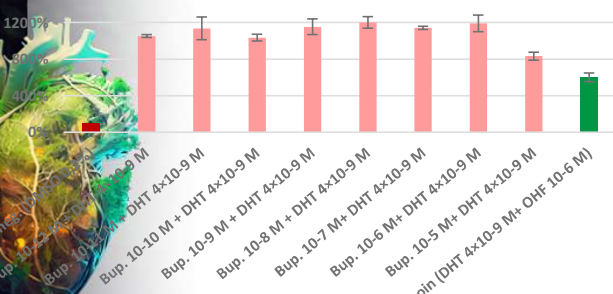
Lignée MDA-kb2 : Etude de l'Effet androgénique et anti-androgénique

Bupirimate

Effet androgénique du Bupirimate (Bup.) sur les cellules MDA-kb2 (Moyenne ± SD) (exprimé en pourcentage de variation par rapport au contrôle négatif)

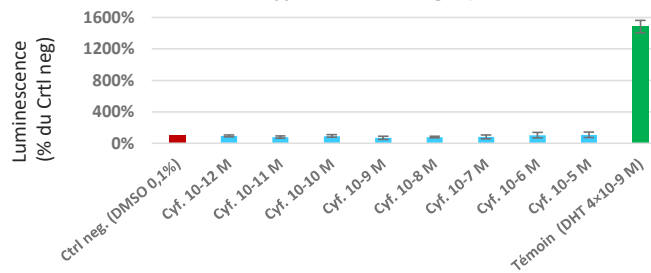


Effet anti-androgénique du Bupirimate (Bup.) sur les cellules MDA-Kb2 (Moyennes ± SD) (exprimé en pourcentage de variation par rapport au contrôle négatif)

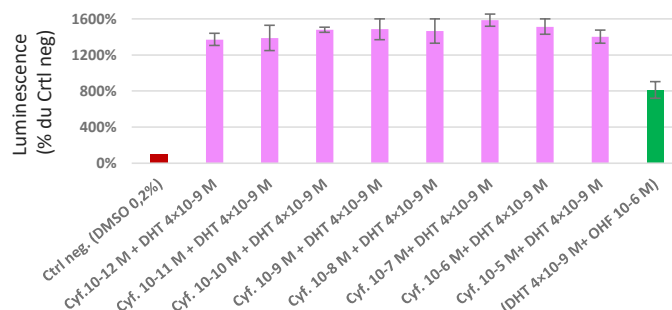


Cyflufénamide

Effet androgénique du Cyflufénamide (Cyf.) sur les cellules MDA-kb2 (Moyennes ± SD) (exprimé en pourcentage de variation par rapport au contrôle négatif)

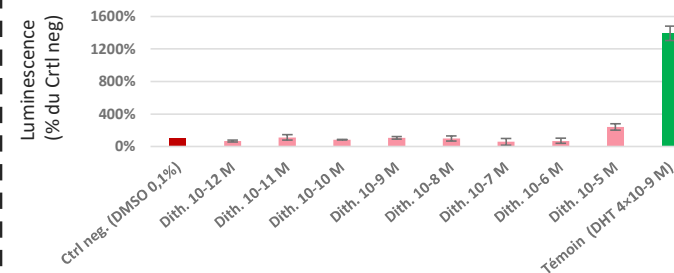


Effet anti-androgénique Cyflufénamide (Cyf.) sur les cellules MDA-Kb2 (Moyennes ± SD) (exprimé en pourcentage de variation par rapport au contrôle négatif)

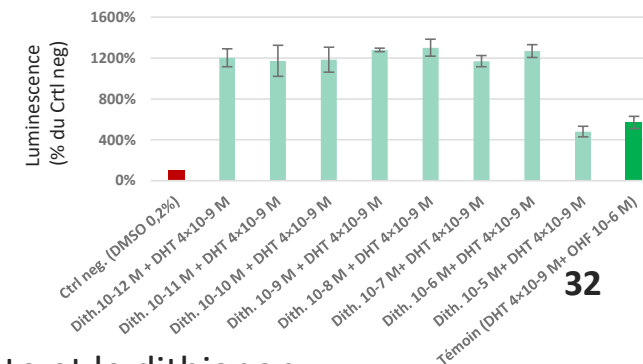


Dithianon

Effet androgénique du Dithianon (Dith.) sur les cellules MDA-kb2 (Moyennes ± SD) (exprimé en pourcentage de variation par rapport au contrôle négatif)



Effet anti-androgénique du Dithianon (Dith.) sur les cellules MDA-Kb2 (Moyennes ± SD) (exprimé en pourcentage de variation par rapport au contrôle négatif)

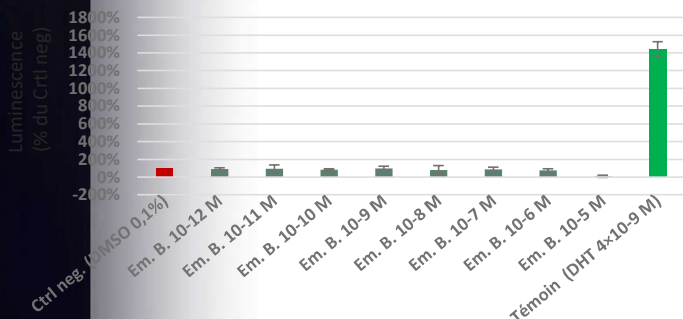


effets anti-androgéniques observés à 10⁻⁵ M pour le bupirimate et le dithianon

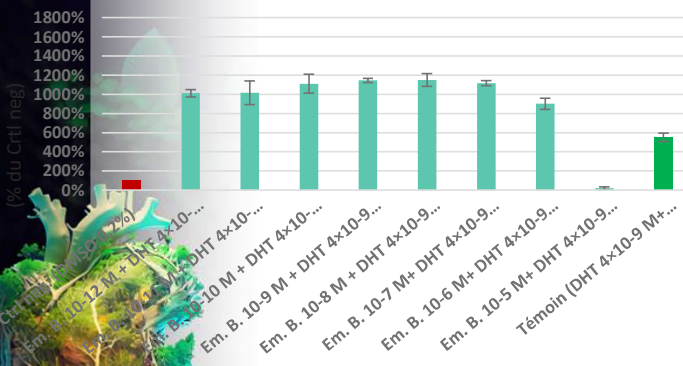
Lignée MDA-kb2 : Effet androgénique et anti-androgénique (suite) : pas d'effet androgénique détecté

Emamectine Benzoate

Effet androgénique de l'Emamectine Benzoate (Em. B.) sur les cellules MDA-kb2 (Moyenne ± SD) (exprimé en pourcentage de variation par rapport au contrôle négatif)



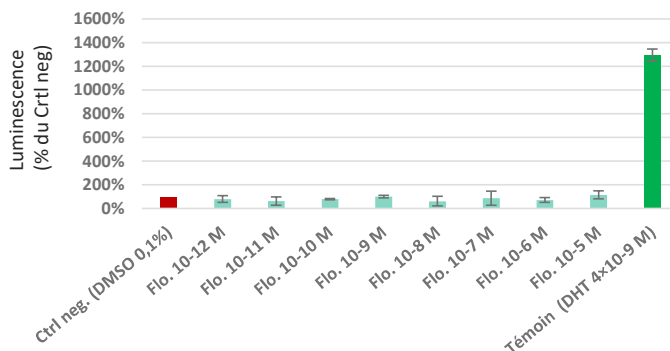
Effet anti-androgénique de l'Emamectine Benzoate (Em.B.) sur les cellules MDA-Kb2 (Moyennes ± SD) (exprimé en pourcentage de variation par rapport au contrôle négatif)



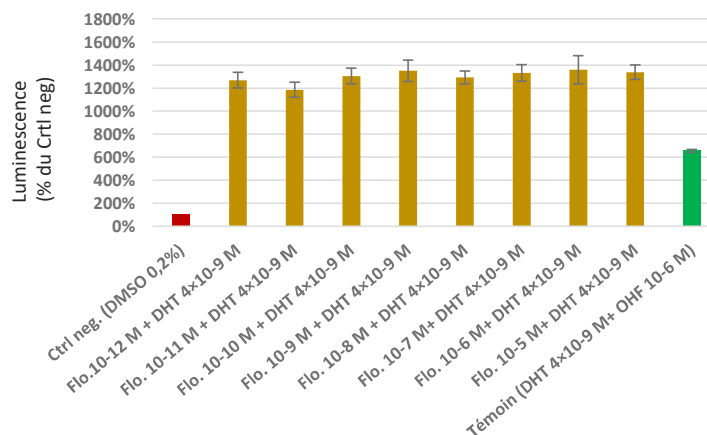
Effet anti-androgénique pour l'Emamectine qui sera à reconfirmer

Flonicamide

Effet androgénique du Flonicamide (Flo.) sur les cellules MDA-kb2 (Moyennes ± SD) (exprimé en pourcentage de variation par rapport au contrôle négatif)

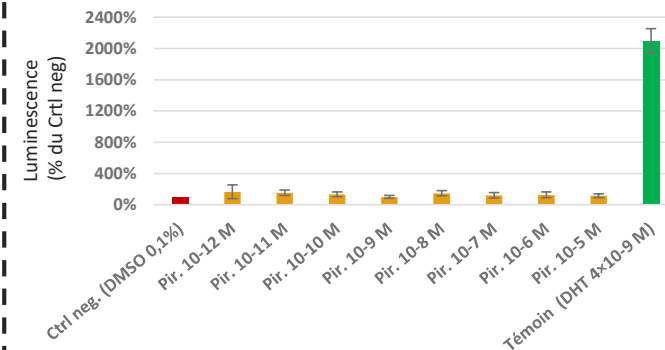


Effet anti-androgénique du Flonicamide (Flo.) sur les cellules MDA-Kb2 (Moyennes ± SD) (exprimé en pourcentage de variation par rapport au contrôle négatif)

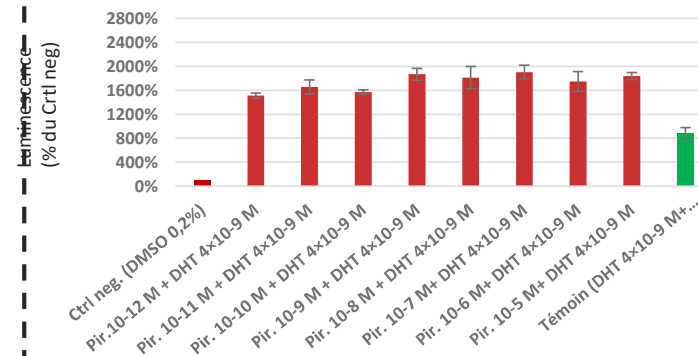


Pirimicarbe

Effet androgénique du Pirimicarbe (Pir.) sur les cellules MDA-kb2 (Moyennes ± SD) (exprimé en pourcentage de variation par rapport au contrôle négatif)



Effet anti-androgénique du Pirimicarbe (Pir.) sur les cellules MDA-Kb2 (Moyennes ± SD) (exprimé en pourcentage de variation par rapport au contrôle négatif)



04. Principaux résultats

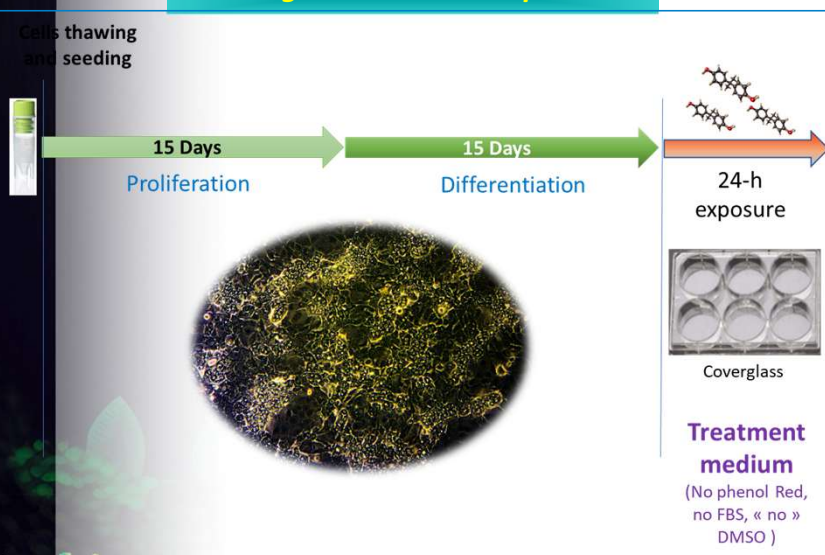
Tâche 2.5 Métabolomique globale par prise d'empreintes 1H-RMN

Évaluer *in vitro* les modulations du métabolisme des cellules humaines hépatiques HepaRG

Effet(s) sur le métabolisme hépatique

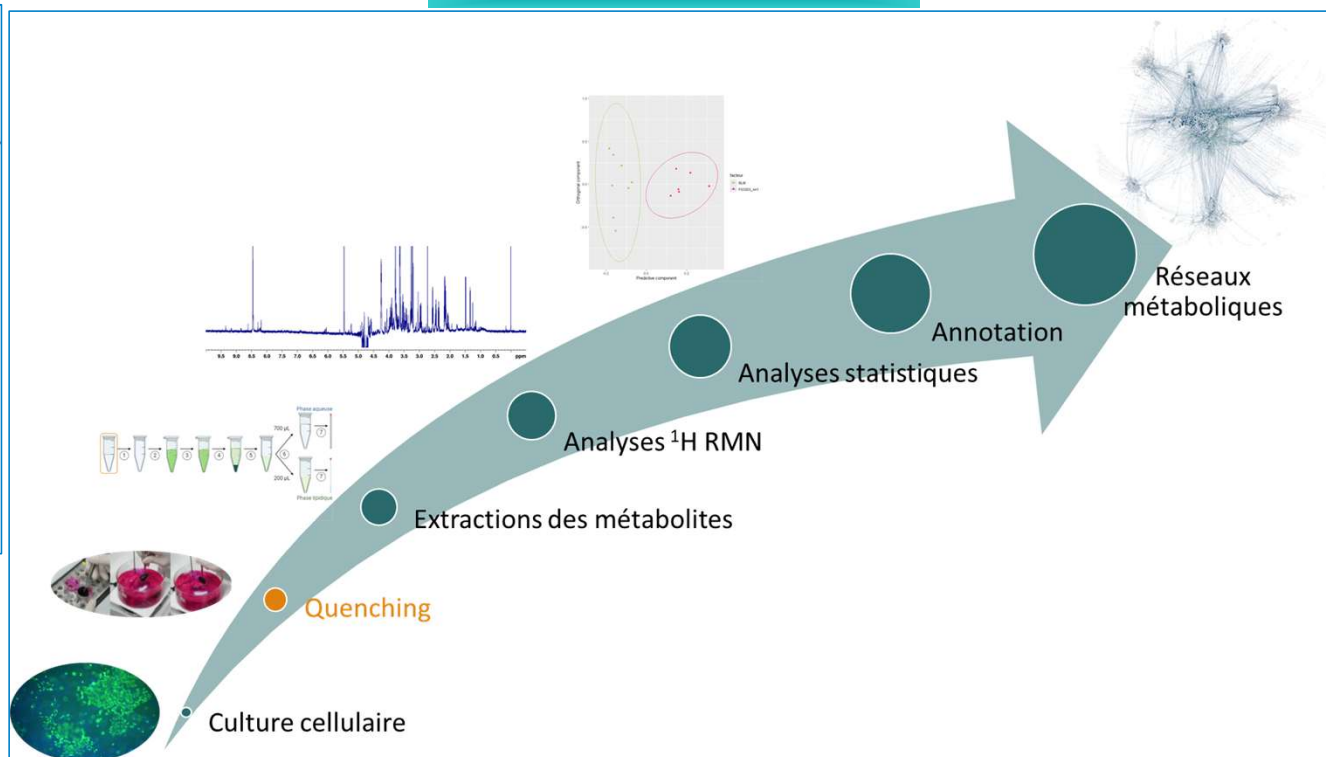
Etude métabolomique sur la lignée HepaRG

La lignée cellulaire HepaRG



- Lignée humaine, très proche des hépatocytes humains
- Modèle de choix pour l'étude du métabolisme des xénobiotiques et de leurs toxicités
- 30j pour obtenir des cellules...

Workflow analytique



Etudes en cours

04. Principaux résultats

- Pas d'effet androgénique des 6 pesticides testés
- Pas d'effet anti-androgénique du Flonicamide
- Effet anti-androgénique du Dithianon et du Bupirimate à 10^{-5} M et du Pirimicarbe à partir de 10^{-10} M -- > **à confirmer**
- Effet cytotoxique de l'Emamectine Benzoate à 10^{-5} M (forte concentration) -- > **à confirmer**

En cours

- Confirmation des premiers résultats sur les cellules MDA-kb2
- Effet(s) de ces pesticides sur le récepteur aux Œstrogènes (cellules MELN)
- Effet(s) de ces pesticides sur le métabolisme hépatique en utilisant le modèle cellulaire HepaRG



04. Principaux résultats

Transect environnemental : Analyses non-ciblées des résidus

Chromatographie Liquide

Système Elute® (Bruker)
Colonne : C18 100x2.1, 1.9µm (Thermo)
Phase mobiles : H₂O/Méthanol/0.1% acide acétique
Débit : 0.3 mL/min à 40°C
Injection : 10µL
Mode gradient 30min (+10min de reconditionnement)



Spectrométrie de masse

Système TIMS-ToF flex (Bruker)
1 analyse avec ionisation Electrospray mode négatif
1 analyse avec ionisation Electrospray mode positif
Gamme de masse 80-800 (m/z)
Résolution en masse 50000
Fragmentation MS/MS en mode CID (PASEF)
Mobilité ionique en mode Survey



Analyse sans a priori LC-HRMS

Edition d'un liste de composés suspects

Validation une approche d'analyse de recherche de suspects (Suspect Screening Analysis) par spectrométrie de masse haute résolution et chromatographie liquide (LC-HRMS) à l'analyse des urines des travailleurs

Préparation des échantillons



LC-HRMS Suspect Screening Analysis

Liste de pesticides utilisés
Liste de métabolites connus (bibliographie)
Liste de métabolites putatifs (expertise)

Extraction non-ciblée des variables.
Correspondance avec la liste de suspects

Quantification relative des biomarqueurs d'exposition

Identification des métabolites (MS/MS, mobilité ionique)



04. Principaux résultats



Transect environnemental : Analyses non-ciblées des résidus

Validation une approche d'analyse de recherche de suspects (Suspect Screening Analysis) par spectrométrie de masse haute résolution et chromatographie liquide (LC-HRMS) à l'analyse des urines des travailleurs

Logiciel Metaboscape® (Bruker)

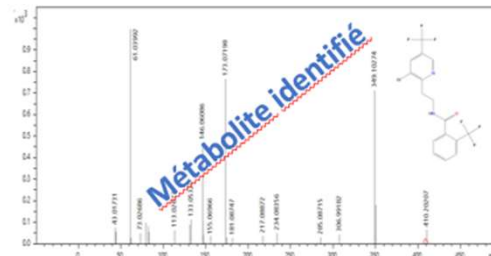
Screening de 20 pesticides et 224 de leurs métabolites connus ou putatifs

Détection de 508 variables dans l'analyse en mode positif et 515 dans l'analyse en mode négatif

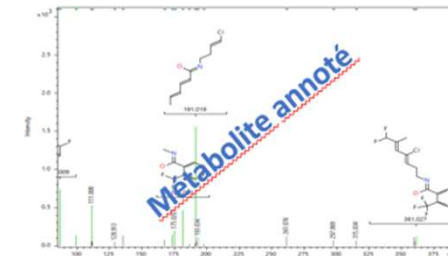
Identification des métabolites par :

- 1- Correspondance entre la masse mesurée et théorique
- 2- Correspondance entre le temps de rétention LC mesuré et celui du standard (si disponible)
- 3- Correspondance entre le massif isotopique mesuré et théorique
- 4- Correspondance entre la valeur de mobilité ionique mesurée et théorique
- 5- Correspondance entre le spectre de fragmentation MS/MS mesuré et :

Le spectre du standard
(si disponible)



Le spectre théorique ou
expertise



Principaux résultats Analyses non-ciblées des résidus

2 Pesticides identifiés dans les urines :

Fluopyram, Tebuconazole

14 Métabolites de pesticides identifiés
(ci-contre)

90 métabolites annotés de façon putative nécessitant encore du retraitement et une biosynthèse de standards (Al-Ayoubi C. et al. Food and Chemical Toxicology, 2022, 167: 113272)

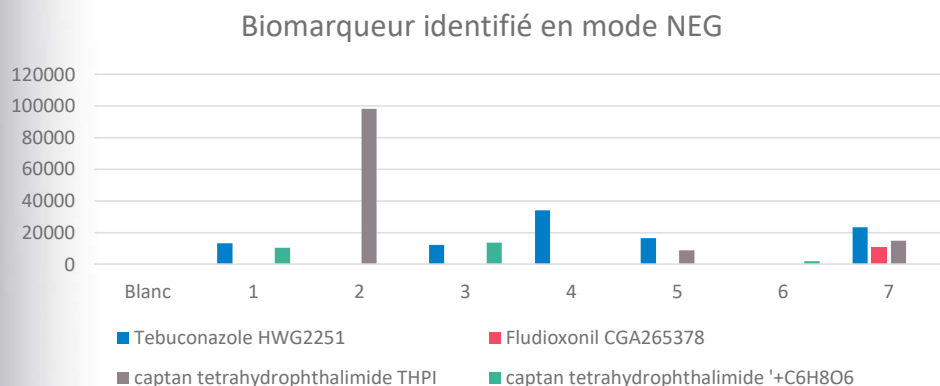
Conclusion :

Mise en évidence de l'exposition aux travailleurs par une analyse non ciblée par LC-HRMS des urines

	rt	m/z	nom
NEG	4.16	342.0829	Captan hydroxytetrahydroptalamide + C6H8O6
	5.78	326.0878	Captan tetrahydroptalamide + C6H8O6
	3.3	150.0556	Captan tetrahydroxyptalamide THPI
	2.5	400.0990	Common Pyrethrenoides hydroxyphenoxybenzeneacetonitrile + C6H8O6
	14.85	333.0968	Dithianon 1,4-dihydroxynaphtalene + C6H8O6
	1.71	277.0018	Fludioxonil CGA 265378
	1.46	395.0442	Fluopyram parent
	10.58	292.1194	Tebuconazole HWG2251
	13.08	306.1373	Tebuconazole parent
	5.83	407.1202	Trifloxystrobin
POS	10.69	187.0752	1-Naphtaleneacetic acid
	3.29	134.0601	Captan tetrahydroptalamide THPI
	1.72	178.0602	Carbendazime Ac
	6.7	226.0900	Common Pyrethrenoides hydroxyphenoxybenzeneacetonitrile
	13.3	161.0597	Dithianon 1,4-dihydroxynaphtalene
	4.91	190.0499	Fluopyram benzamide (M25)
	7.3	374.0847	Pyraclostrobin Ac
	4.09	168.1109	Pyrimicarbe DDHP
	2.64	154.0974	Pyrimicarbe MDHP
	4.28	294.1369	Tebuconazole HWG2251
1.58	359.0407	Thiophanatemethyl 4 hydroxy	

04. Principaux résultats

Exemples de répartition et intensité des biomarqueurs identifiés parmi les individus

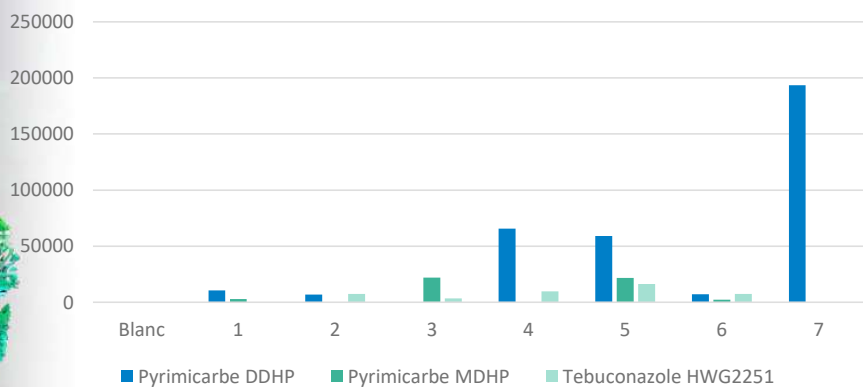


Grande variabilité propre aux analyses sur échantillons humain

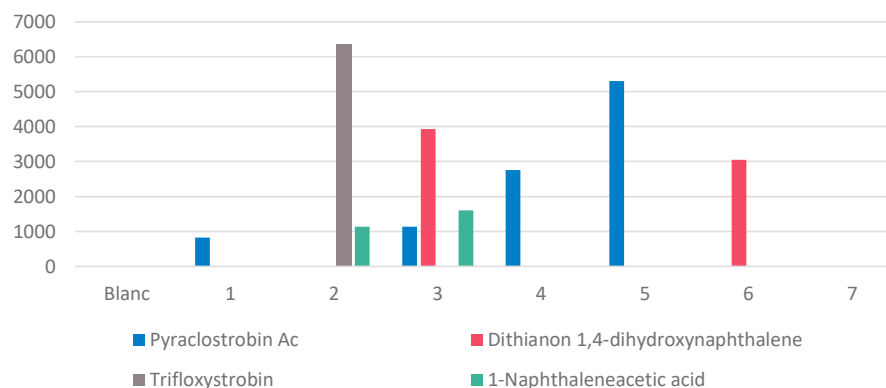
Perspectives :

- Analyse sur une plus grande cohorte d'individus afin de réaliser des statistiques de type ACP, PLSDA
- Comparaison relatives des quantifications entre les travailleurs

Biomarqueur identifié en mode POS



Biomarqueur identifié en mode POS



05. Perspectives

- Définir le lien entre exposition des arboriculteurs et contaminations des feuilles et fruits, en fonction des tâches des travailleurs
- Confirmation des premiers résultats sur les cellules MDA-kb2
- Effet(s) de ces pesticides sur le récepteur aux Œstrogènes (cellules MELN)
- Effet(s) de ces pesticides sur le métabolisme hépatique en utilisant le modèle cellulaire HepaRG
- Finaliser les travaux de transferts dermiques

Transect environnemental

- Confirmation des 90 annotations pour caractériser l'exposition de plus de pesticides
- Comparer les quantifications relatives des biomarqueurs entre les travailleurs

Proposition de réduction de l'exposition aux PPs : Co-construction avec les arboriculteurs



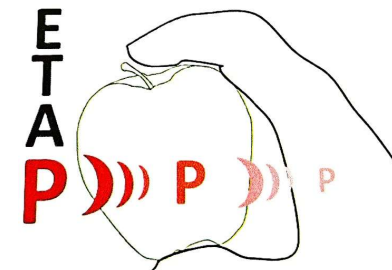
06. Transfert & valorisation de ces résultats

- Présentation des résultats aux acteurs de terrain
- Présentation des résultats sous la forme d'un webinaire à l'ARET (Automne 2025) :
« ETAP : Exposition de travailleurs agricoles aux produits phytopharmaceutiques en vergers de pommiers : de la contamination à l'impact endocrinien »
- Publication 1 sur les effets endocriniens des pesticides (en complément des dosages hormonaux)
- Publication 2 sur les modulations métaboliques hépatiques des cellules HepaRG à la suite de l'exposition aux pesticides
- Transect environnemental : publication des quantifications relatives (2026)



Remerciements

- Cette recherche ne peut être conduite sans :
 - la participation des arboriculteurs (chefs d'exploitations, travailleurs),



**Nicolas Cabaton, Elodie Person,
Rayan Prado, Olha Tsykhotska,
Sandrine Bruel,
Daniel Zalko et François Laurent**



**Romain Vuillaume, Laurent
Debrauwer, Emilien Jamin**

