

EVALUATION DES MECANISMES TOXICOCINETIQUES IMPLIQUES DANS L'EXPOSITION FŒTALE A UN MELANGE DE PESTICIDES SUR LE MODELE DE LA BREBIS GRAVIDE 1

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Alexi VERMOT-DESROCHES

Né, le 23 avril 1993 à Besançon (25)

Directeur de thèse : Mme Nicole HAGEN

JURY

PRESIDENT :

Mr Roger LEANDRI

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

Mme Nicole HAGEN

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Mme Véronique GAYRARD

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRES INVITES :

Mme Catherine VIGUIE

Maître de Conférences à l'INRA

**Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur par intérim : Frédéric Bousquet

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1° CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie Vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme **HAGEN-PICARD, Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

PROFESSEURS 2° CLASSE

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
- M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*

PROFESSEURS CERTIFIÉS DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
- M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFÉRENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
- Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*
- Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophtalmologie vétérinaire et comparée*
- Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
- Mme **JOURDAN Geraldine**, *Anesthésie - Analgésie*
- Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*
- Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
- M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
- M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
- Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*
- Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
- M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire – Maladies animales règlementées*
- Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT CONTRACTUELS

- M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- M. **LEYNAUD Vincent**, *Médecine interne*
- Mme **ROBIN Marie-Claire**, *Ophtalmologie*
- M. **TOUITOU Florian**, *Alimentation animale*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mme **BLONDEL Margaux**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie-Imagerie médicale*
- M. **COMBARROS-GARCIA Daniel**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **GAIDE Nicolas**, *Histologie, Anatomie Pathologique*
- M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- M. **LESUEUR Jérémy**, *Gestion de la santé des ruminants – Médecine collective de précision*

Remerciements

À Monsieur le Professeur Roger Leandri

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

Médecine de la reproduction

Qui nous fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de thèse.

Hommages respectueux.

À Madame le Professeur Nicole Hagen-Picard

Professeur de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie de la Reproduction – Physiopathologie et Toxicologie Expérimentale

Pour m'avoir fait l'honneur d'être ma directrice de thèse,

Pour ce que j'ai appris à vos côtés.

Mes sincères remerciements.

À Madame le Professeur Véronique Gayraud

Professeur de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Physiologie – Toxicologie alimentaire – Gestation et Perturbation Endocrinienne

Pour l'aide apportée au long de la thèse, lors des chirurgies et de l'analyse des données,

Pour avoir accepté de prendre part à ce jury de thèse.

Mes sincères remerciements.

À Madame le Docteur Catherine Viguié

Directrice de recherche à l'Institut National de la Recherche Agronomique de Toulouse

Toxicologie alimentaire – Gestation et Perturbation Endocrinienne

Pour l'aide apportée au long de la thèse,

Pour avoir accepté d'assister à cette soutenance de thèse.

Mes sincères remerciements.

Table des matières

| | |
|---|-----------|
| Remerciements | 5 |
| Table des figures..... | 8 |
| Table des tableaux..... | 10 |
| Liste des abréviations..... | 12 |
| Introduction | 13 |
| I. Caractéristiques physico-chimiques et toxicologiques des six pesticides et exposition alimentaire | 15 |
| A. Boscalide..... | 15 |
| 1. Caractéristiques physico-chimiques et toxicologiques..... | 15 |
| 2. Exposition alimentaire..... | 16 |
| B. Captane | 17 |
| 1. Caractéristiques physico-chimiques et toxicologiques..... | 17 |
| 2. Exposition alimentaire..... | 19 |
| C. Chlorpyrifos éthyl..... | 20 |
| 1. Caractéristiques physico-chimiques et toxicologiques..... | 20 |
| 2. Exposition alimentaire..... | 21 |
| D. Méthyl-thiophanate | 22 |
| 1. Caractéristiques physico-chimiques et toxicologiques..... | 22 |
| 2. Exposition alimentaire..... | 23 |
| E. Thiaclopride | 24 |
| 1. Caractéristiques physico-chimiques et toxicologiques..... | 24 |
| 2. Exposition alimentaire..... | 24 |
| F. Zirame | 25 |
| 1. Caractéristiques physico-chimiques et toxicologiques..... | 25 |
| 2. Exposition alimentaire..... | 26 |
| G. Synthèse des caractéristiques des 6 pesticides | 27 |
| II. Etude expérimentale : disposition des 6 pesticides dans l'unité materno-foeto-placentaire sur le modèle de brebis gravide..... | 29 |
| A. Matériels et méthodes | 29 |
| 1. Système biologique | 29 |
| 2. Méthodologie expérimentale | 30 |
| a. Détermination des doses à administrer : études préliminaires | 30 |
| b. Préparation des solutions de pesticides | 33 |
| c. Modalité d'administration et de collecte des échantillons..... | 34 |
| d. Modalités de traitement des échantillons sanguins et de liquide amniotique..... | 35 |
| 3. Méthode de dosage des pesticides..... | 35 |

| | | |
|------|--|----|
| B. | Analyse des données | 37 |
| III. | Analyse des résultats et discussion | 39 |
| A. | Boscalide..... | 40 |
| | <i>Paramètres toxicocinétiques du boscalide</i> | 41 |
| | <i>Transferts fœto-maternel et materno-fœtal du boscalide</i> | 42 |
| B. | THPI (métabolite du Captane)..... | 43 |
| | <i>Paramètres toxicocinétiques du captane</i> | 45 |
| | <i>Transferts fœto-maternel et materno-fœtal du captane</i> | 46 |
| C. | Chlorpyrifos éthyl..... | 47 |
| | <i>Paramètres toxicocinétiques du chlorpyrifos éthyl</i> | 47 |
| | <i>Transferts fœto-maternel et materno-fœtal du chlorpyrifos</i> | 48 |
| D. | Méthyl-thiophanate | 50 |
| | <i>Paramètres toxicocinétiques</i> | 51 |
| | <i>Transferts fœto-maternel et materno-fœtal</i> | 52 |
| E. | Thiaclopride | 53 |
| | <i>Paramètres toxicocinétiques</i> | 54 |
| | <i>Transferts fœto-maternel et materno-fœtal</i> | 55 |
| F. | Zirame | 56 |
| | <i>Paramètres toxicocinétiques</i> | 56 |
| | <i>Transferts fœto-maternel et materno-fœtal du zirame</i> | 57 |
| IV. | Discussion générale..... | 58 |
| | Conclusion..... | 62 |
| | Bibliographie..... | 64 |

Table des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Voies de biotransformation du captane in vivo chez l'animal et in vitro (d'après Berthet, 2012)..... | 18 |
| Figure 2 : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques maternelles (bleu) et fœtales (orange) moyennes (\pm ET) de boscalide après une injection IV de 1 mg/kg de boscalide à 4 brebis gravides..... | 40 |
| Figure 3 : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques maternelles (bleu) et fœtales (orange) moyennes (\pm ET) de boscalide après une injection IV de 1 mg/kg de boscalide à 3 fœtus cathétérés. | 41 |
| Figure 4 : Taux de transfert materno-fœtal (n=5) et fœto-maternel (n=3) moyens après une injection IV de boscalide (0.5 mg/kg) à des brebis gravides et leur fœtus cathétéré. | 42 |
| Figure 5 : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques maternelles (bleu) et fœtales (orange) et du liquide amniotique (gris) (moyennes \pm ET) de THPI (métabolite du captane) après une injection IV de 5 mg/kg de captane à 4 brebis gravides. | 43 |
| Figure 6 : Évolution temporelle des concentrations plasmatiques fœtales (orange, moyennes \pm ET) et du liquide amniotique (gris) (pour un seul fœtus) de THPI (métabolite du captane) après une injection IV de 5 mg/kg de captane à 3 fœtus cathétérés. | 45 |
| Figure 7 : Taux de transfert materno-fœtal (n=5) et fœto-maternel (n=3) moyens après une injection IV de captane (5 mg/kg) à des brebis gravides et à leur fœtus cathétéré. Le transfert fœto-maternel du THPI n'a pas pu être calculé. Le taux de transfert fœto-maternel maximal a été estimé en considérant des concentrations maternelles en THPI au niveau de la LOQ pendant 10 min, après une administration fœtale de THPI. | 46 |
| Figure 8 : Évolution temporelle des concentrations plasmatiques maternelles moyennes (\pm ET) de chlorpyrifos éthyl après une injection IV de 0.5 mg/kg de chlorpyrifos éthyl à 4 brebis gravides. | 47 |
| Figure 9 : Taux de transfert placentaire fœto-maternel maximum après une injection IV de chlorpyrifos éthyl (0.5mg/kg) à des brebis gravides et à leur fœtus cathétéré. Les clairances placentaires n'ont pas pu être calculées. Le transfert fœto-maternel a été estimé inférieur à 15 %, en prenant en compte une concentration maternelle maximale à la LOQ 10 min après l'administration fœtale, sur 3 couples mère-fœtus. | 49 |
| Figure 10 : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques maternelles (bleu) et fœtales (orange) et du liquide amniotique (gris) (moyennes \pm ET) de méthyl-thiophanate après une injection IV de 4 mg/kg de méthyl-thiophanate à 4 brebis gravides. | 50 |
| Figure 11 : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques maternelles (bleu) et fœtales (orange) et du liquide amniotique (gris) (moyennes \pm ET) de méthyl-thiophanate après une injection IV de 4 mg/kg de méthyl-thiophanate à 3 fœtus cathétérés..... | 51 |

| | |
|---|----|
| Figure 12 : Taux de transfert materno-fœtal (n=5) et fœto-maternel (n=3) moyens après une injection IV de méthyl-thiophanate (4 mg/kg) à des brebis gravides et à des fœtus cathétérisés. | 52 |
| Figure 13 : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques maternelles (bleu) et fœtales (orange) et du liquide amniotique (gris) (moyennes ± ET) de thiaclopride après une injection IV de 0.5 mg/kg de thiaclopride à 4 brebis gravides..... | 53 |
| Figure 14 : Évolution temporelle des concentrations plasmatiques maternelles (bleu) et fœtales (orange) et du liquide amniotique (gris) (moyennes ± ET) de thiaclopride après une injection IV de 0.5 mg/kg de thiaclopride à 3 fœtus cathétérisés. | 54 |
| Figure 15 : Taux de transfert materno-fœtal (n=5) et fœto-maternel (n=3) moyens après une injection IV de thiaclopride (0.5 mg/kg) à des brebis gravides et à leur fœtus cathétérisés. | 55 |
| Figure 16 : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques maternelles (bleu) (moyennes ± ET) de zirame après une injection IV de 0.3 mg/kg de zirame à 3 brebis gravides. | 56 |
| Figure 17 : Taux de transfert fœto-maternel maximal après une injection IV de Zirame (0.3 mg/kg) à des brebis gravides et leur fœtus cathétérisé. Les clairances placentaires n'ont pas pu être calculées. Le transfert fœto-maternel a été estimé inférieur à 15 %, en prenant en compte une concentration maternelle maximale à la LOQ 10 min après l'administration fœtale, sur 3 couples mère-fœtus. | 57 |

Table des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau 1 : Quantité produite et/ou importée sur le territoire de l'Espace Économique Européen (EEE) de cinq des six pesticides de l'étude (https://echa.europa.eu/information-on-chemicals). NA : information indisponible. | 15 |
| Tableau 2 : Principales propriétés chimiques, toxicologiques et repères toxicologiques de référence des six pesticides. ND : non déterminé | 27 |
| Tableau 3 : Classification toxicologique et exposition moyenne alimentaire par rapport à la DJA, estimée en France dans les EAT2 et EATi dans la population infantile et générale et principaux aliments contributeurs pour les 6 pesticides de l'étude. ND : non déterminé..... | 28 |
| Tableau 4 : Cinétique de décroissance des concentrations plasmatiques ($\mu\text{g/mL}$) de 5 pesticides après une administration intraveineuse à une brebis des 5 pesticides en cocktail... | 30 |
| Tableau 5 : Doses des 6 pesticides, sélectionnées a priori, pour évaluer les paramètres toxicocinétiques et que le mélange soit proportionnel à la DJA (facteur 100) (sauf pour le chlorpyrifos, facteur 1000)..... | 31 |
| Tableau 6 : Doses de pesticides choisies pour l'étude toxicocinétique, compte tenu de la toxicité du mélange et de la solubilité des pesticides dans le DMSO | 33 |
| Tableau 7 : Doses des pesticides administrées aux brebis et aux fœtus (poids du fœtus arbitrairement fixé à 3 kg) et concentrations des solutions correspondantes dans le DMSO .. | 33 |
| Tableau 8 : Rapport des doses réelles et théoriques administrées aux fœtus cathétérisés et nombre de fœtus par portée..... | 34 |
| Tableau 9 : Polarité, rapport masse sur charge et temps de rétention des six pesticides et de l'atrazine deutéré utilisé comme étalon interne..... | 36 |
| Tableau 10 : Valeurs des LOD de la méthode de dosage par UHPLC pour les six pesticides étudiés..... | 39 |
| Tableau 11 : Principaux paramètres toxicocinétiques du boscalide chez 4 brebis gravides et 2 fœtus cathétérisés après une administration IV de boscalide à la dose de 1 mg/kg. | 42 |
| Tableau 12 : Principaux paramètres toxicocinétiques du THPI (métabolite du captane) chez 4 brebis gravides après une administration IV de captane (5 mg/kg) ; * pour les brebis 3 et 4 les premières valeurs dosées étaient hors gamme. Les échantillons seront redosés. Les clairances plasmatiques fœtales ont été calculées avec les AUC0-last et pas avec les AUC0-inf, en raison de la difficulté à estimer la pente terminale. | 45 |
| Tableau 13 : Principaux paramètres toxicocinétiques du chlorpyrifos éthyl chez 4 brebis gravides après une administration IV de chlorpyrifos éthyl (0.5 mg/kg). Les paramètres toxicocinétiques du chlorpyrifos dans le compartiment fœtal n'ont pas pu être déterminés. ND : non déterminés. | 48 |

| | |
|---|----|
| Tableau 14 : Principaux paramètres toxicocinétiques du méthyl-thiophanate chez 4 brebis gravides et 2 de leur fœtus cathétérisés après une administration unique en IV de méthyl-thiophanate (4 mg/kg) | 52 |
| Tableau 15 : Principaux paramètres toxicocinétiques du thiaclopride chez 4 brebis gravides et 2 de leur fœtus cathétérisés après une administration IV de thiaclopride (0.5 mg/kg) | 55 |
| Tableau 16 : Principaux paramètres toxicocinétiques du zirame chez 3 brebis gravides après une administration unique en IV de zirame (0.3 mg/kg)..... | 57 |
| Tableau 17 : Bilan des clairances plasmatiques maternelles, des demi-vies d'élimination plasmatiques maternelles et des volumes de distribution à l'équilibre maternels des six pesticides évalués chez 4 brebis gravides et interprétation par rapport aux constantes physiologiques : débit cardiaque de la brebis : 86 mL/(kg.min) et volume plasmatique : 40 mL/kg, (d'après Toutain et al., 2004)..... | 58 |
| Tableau 18 : Bilan des clairances plasmatiques fœtales, des demi-vies d'élimination fœtales et des volumes de distribution à l'équilibre des six pesticides étudiés chez les fœtus ovins et interprétation par rapport aux constantes physiologiques (débit cardiaque fœtal de 400 mL/(kg.min) d'après Gauderat, 2016 et volume plasmatique : 40 mL/kg d'après Toutain et al., 2004)..... | 60 |
| Tableau 19 : Comparaison des expositions internes et externe fœtale (dose reçue par le fœtus via sa mère), à celles de sa mère. Extrapolation à une exposition fœtale maximale (en % de la DJA) pour une exposition alimentaire humaine (d'après EAT2 et EATi) et en considérant une biodisponibilité et une absorption totales..... | 62 |

Liste des abréviations

Anses : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ARfD : Acute Reference dose ou dose de référence aiguë

AUC : Area under the curve ou aire sous la courbe des concentrations

CE : Communauté Européenne

Cl : Clairance

DJA : Dose Journalière Admissible

DL50 : Dose Létale 50

DMSO : diméthylsulfoxyde

EAT2 : Étude de l'Alimentation Totale 2

EATI : Étude de l'Alimentation Totale Infantile

EEE : Espace Économique Européen

F_{fm} pesticide : fraction de la dose fœtale de chaque pesticide, transférée à la mère qui atteint la circulation maternelle

F_{mf} pesticide : fraction de la dose maternelle de chaque pesticide, transférée au fœtus qui atteint la circulation fœtale

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

IV : Intraveineuse

LMR : limite maximale de résidus

LOD : Limit Of Detection ou limite de détection

LOQ : Limit Of Quantification ou limite de quantification

LogP : coefficient de partage octanol/eau

MRT : Mean Retention Time ou temps de résidence moyen

ND : Non déterminé

NOAEL : No Observed Adverse Effect Level ou dose sans effet observable

OMS : Organisation Mondiale de la Santé ou WHO pour World Health Organization

$t_{1/2}$: temps de demi-vie

THPI : tétrahydrophtalimide

UE : Union Européenne

VO : voie orale

Vss : Volume de distribution à l'équilibre

Introduction

En raison de leur usage intensif en agriculture, les pesticides constituent une source majeure de contamination des aliments et de l'eau. Certains pesticides sont susceptibles de contenir des perturbateurs endocriniens et sont soupçonnés d'être responsables d'une recrudescence des cas d'infertilité, et de provoquer une baisse du quotient intellectuel ou des maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson.

Le projet GePeTho, mené au sein de l'équipe Gestation Perturbateurs endocriniens de l'UMR INRA/ENVIT Toxalim, a pour objectif d'établir les bases scientifiques pour une approche intégrative des effets perturbateurs thyroïdiens des pesticides pendant la gestation. En effet la période de développement fœtal est particulièrement vulnérable à toute perturbation thyroïdienne et la fonction thyroïdienne constitue une fonction critique pour le développement du système nerveux. Ce projet prend en compte deux volets importants du risque lié à l'exposition aux pesticides, *i.e.* l'exposition fœtale, et la dangerosité des pesticides sur la fonction thyroïdienne.

Notre étude s'inscrit dans le projet GePeTho et a pour objectif de déterminer les mécanismes toxicocinétiques déterminant l'exposition à un mélange de six pesticides dans l'unité materno-fœto-placentaire. Le modèle expérimental choisi est la brebis gravide instrumentée, qui est pertinent vis-à-vis de l'homme en termes de physiologie de la gestation et de régulation de la fonction thyroïdienne. Les six pesticides étudiés, le boscalide, le captane, le chlorpyrifos éthyl, le méthyl-thiophanate, le thiaclopride et le zirame, sont fréquemment utilisés pour le traitement des vergers et communément retrouvés sur les pommes dans le sud-ouest de la France. Leur utilisation est autorisée en France par l'Anses, ils sont retrouvés dans divers produits phytosanitaires.

Ce projet s'inscrit également dans l'actualité : en effet, les évolutions sociétales actuelles avec une émergence d'une conscience écologique conduit à une remise en cause de l'utilisation des pesticides par une forte proportion de la population. Ce thème est devenu très médiatique et la dangerosité des pesticides fait l'objet de nombreux débats dans la communauté scientifique. Par exemple, au printemps 2018, le boscalide a été médiatisé avec d'autres molécules de son groupe, les inhibiteurs de la succinate déshydrogénase, à la suite d'une tribune publiée le 15 avril 2018 dans *Libération* et menée par « un collectif de chercheurs, cancérologues, médecins et toxicologues, du CNRS, de l'Inserm, de l'Université et de l'Inra. » alertant sur la dangerosité potentielle des molécules de ce groupe. Dans ce contexte, l'évaluation de l'exposition fœtale aux pesticides présente un enjeu sociétal et scientifique important.

Dans une première partie bibliographique, les propriétés physicochimiques et toxicologiques des six pesticides sont résumées. Puis l'étude expérimentale est présentée : l'ensemble des matériels et méthodes utilisés pour mener à bien ce projet est décrit. Les résultats sont ensuite présentés et interprétés, avant de conclure sur le risque d'exposition fœtale à ces pesticides.

I. Caractéristiques physico-chimiques et toxicologiques des six pesticides et exposition alimentaire

Les six pesticides étudiés dans ce projet sont le boscalide, le captane, le chlorpyrifos éthyl, le méthyl-thiophanate, le thiaclopride et le zirame. Le tableau 1 présente le tonnage produit et/ou importé annuellement de ces pesticides sur le territoire européen.

| Molécule | Boscalide | Captane | Chlorpyrifos éthyl | Méthyl-thiophanate | Thiaclopride | Zirame |
|--|------------------|----------------------|--------------------|--------------------|--------------|----------------------|
| Quantité produite et/ou importée sur l'EEE | 1 – 10 tonnes/an | 100 – 1000 tonnes/an | 1 – 10 tonnes/an | 1 – 10 tonnes/an | NA | 100 – 1000 tonnes/an |

Tableau 1 : Quantité produite et/ou importée sur le territoire de l'Espace Économique Européen (EEE) de cinq des six pesticides de l'étude (<https://echa.europa.eu/information-on-chemicals>). NA : information indisponible.

A. Boscalide

1. Caractéristiques physico-chimiques et toxicologiques

Le boscalide est un fongicide à large spectre de la classe des carboxines, son mode d'action est celui des inhibiteurs de la succinate déshydrogénase. Il est approuvé par l'Anses et il est utilisé dans quarante produits phytosanitaires autorisés en France (Anses, *Boscalid*, 2019).

Le boscalide a une solubilité dans l'eau de 4.64 mg/L, son coefficient de partage octanol/eau (logP) est de 2.96 à 21°C et au pH de 7.1. Il est relativement stable dans l'eau, la demi-vie pour son hydrolyse est supérieure à 60 jours au pH de 5 à 9, sa demi-vie pour la photolyse dans l'eau est supérieure à 30 jours (Agritox, *Boscalid*, 2006).

Les caractéristiques toxicocinétiques du boscalide ont été évaluées chez le rat, après une administration orale, à la dose de 50 mg/kg. Son absorption est de 44 %. Il ne s'accumule pas dans l'organisme et est éliminé à 80 % dans les fèces et 20 % dans les urines. Le métabolisme du boscalide met en jeu des réactions d'hydroxylation et la formation de glucuronoconjugués et de conjugués au glutathion (Agritox, *Boscalid*, 2006).

Les études toxicologiques ont permis de définir les repères toxicologiques suivants (Agritox, *Boscalid*, 2006) :

- DJA : 40 µg/kg/j
- NOAEL subchronique (90 j) : 34-40 mg/kg/j chez le rat ; 7.6-8.1 mg/kg/j chez le chien
- Toxicité aiguë VO : DL50 rat > 5000 mg/kg

2. Exposition alimentaire

Dans les Études de l'Alimentation menées par l'ANSES, le boscalide a été détecté dans 3.4% des 611 échantillons alimentaires analysés pour l'ensemble de la population (Anses, *Étude de l'Alimentation Totale 2*, 2011) et dans 22.3% de des échantillons analysés destinées à la population infantile (Anses, *Étude de l'Alimentation Totale Infantile*, 2016).

Dans l'EAT2, le boscalide est détecté dans 22.7% des échantillons de fruits (sur 75 échantillons analysés) et dans 3.7% des échantillons de légumes (sur un total de 267 échantillons analysés).

Dans l'EATi, le boscalide est détecté dans 8 des 11 échantillons de potages et purées infantiles, dans 33% des échantillons de céréales infantiles (sur 15 analysés), dans 13% des échantillons de boissons lactées infantiles (sur 8 analysés), dans 4% des échantillons de pots de fruits infantiles (sur 28 analysés), dans 78% des échantillons de pots de légumes infantiles (sur 27 analysés), dans 71% des échantillons de pots de légumes/viande ou légumes/poisson (sur 45 analysés) et dans 73% des échantillons de potages et purées (sur 11 analysés).

L'Anses estime à environ 0.11 µg/kg/j (selon l'hypothèse haute) l'exposition moyenne des enfants au boscalide entre 0 et 36 mois, la DJA étant de 40 µg/kg/j. Il fait partie des 11 pesticides les plus détectés dans cette étude EATi.

B. Captane

Dans le cadre des plans de surveillance des états membres de l'UE, le captane a été considéré prioritaire en raison de dépassement de la LMR (10 µg/kg) dans des aliments pour bébés sur 7 analyses en 2009 et 26 en 2010 (EFSA, 2011 et EFSA 2013).

1. Caractéristiques physico-chimiques et toxicologiques

Le captane est un fongicide de contact de la classe des dicarboximides utilisé dans les cultures fruitières et légumières, son mode d'action consiste en l'inhibition du mécanisme de respiration des champignons, ce qui en fait un fongicide à spectre large. Il est approuvé par l'Anses et on peut le retrouver dans dix produits phytosanitaires autorisés en France, il est utilisé sur de nombreuses cultures fruitières (Anses, *Captan*, 2019).

Le captane a une solubilité dans l'eau de 4.9 à 5.2 mg/L à 20°C et au pH de 7. Son coefficient de partage octanol/eau est de 2.57 à 20°C et au pH de 7. Il est peu stable dans l'eau avec une demi-vie pour l'hydrolyse de 11-18.8 h à 25°C au pH de 5 et de 2.6-4.9 h à 25°C au pH de 7 (Agritox, *Captane*, 2009).

Les caractéristiques toxicocinétiques du captane ont été déterminées chez le rat, après une administration orale (Agritox, *Captane*, 2009) :

Son absorption est rapide et quasiment complète à faible dose (81 %). Le captane ne s'accumule pas et est largement distribué dans l'organisme. Il est rapidement éliminé dans les urines et les fèces. Dans l'organisme, le captane est rapidement métabolisé en son principal métabolite, le tétrahydrophtalimide (THPI), après une administration orale dans les milieux acides stomacaux ou dès son arrivée dans la circulation systémique (en 0.97 s). C'est la raison pour laquelle, ce métabolite est souvent évalué dans les études toxicocinétiques (Berthet et coll, 2012). Il est également métabolisé en d'autres dérivés dicarboximide : 3-hydroxy-THPI, THPI epoxyde ; 5 hydroxy-THPI ; THPAM et acide 3 hydroxyTHPamique (Figure 1).

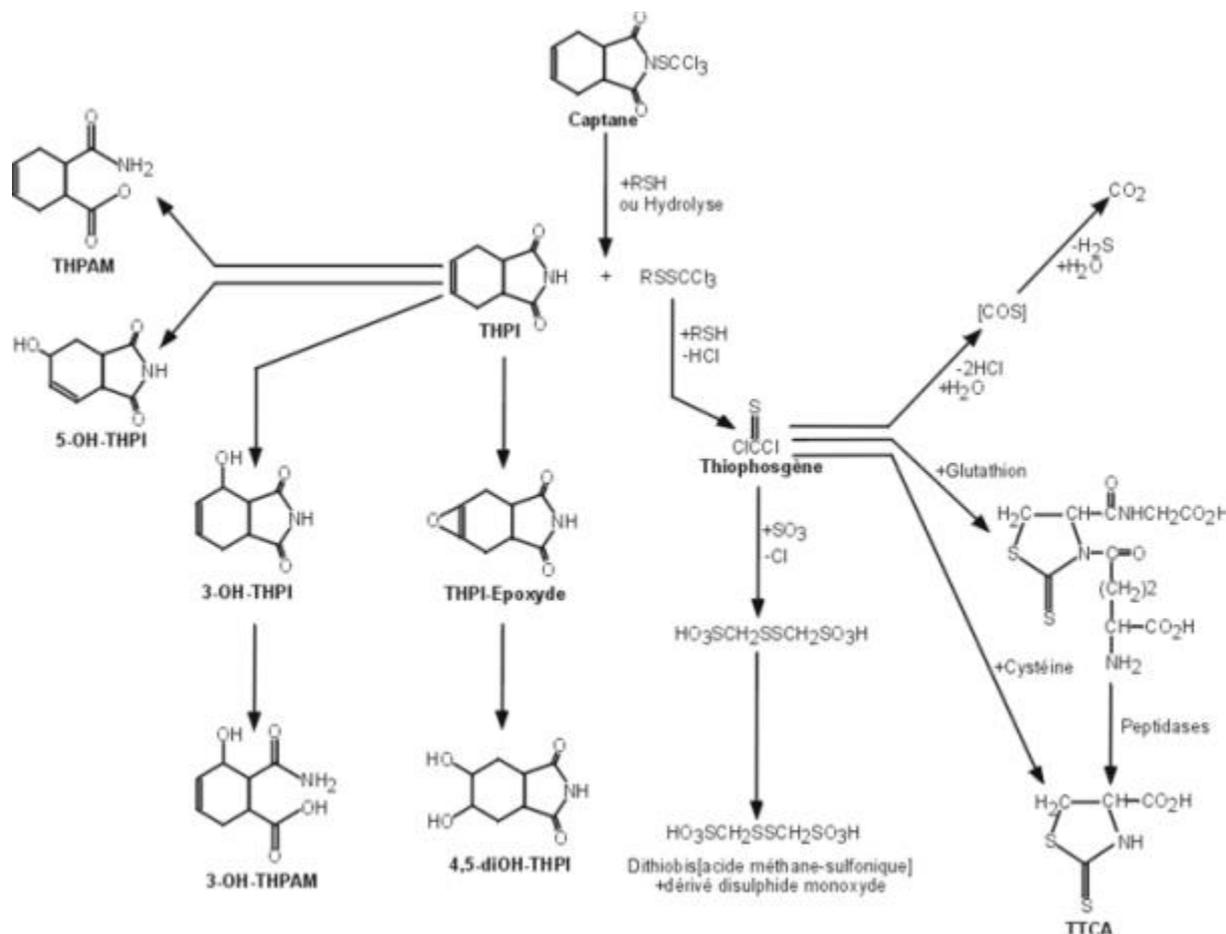


Figure 1 : Voies de biotransformation du captane in vivo chez l'animal et in vitro (d'après Berthet, 2012)

Les études toxicologiques ont permis de définir les repères toxicologiques suivants (Agritox, Captane, 2009) :

- DJA : 100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$, établie sur la base d'une étude développement chez le lapin
- NOAEL subchronique (90 j) : 60 $\text{mg}/\text{kg}/\text{j}$ chez le chien
- Toxicité aiguë VO : DL50 rat > 2000 mg/kg
- ARfD : 0.3 mg/kg (lapin)

Le captane est classé cancérigène de catégorie 2 selon le règlement (CE) n°1272/2008.

Il semble que le THPI a une toxicité inférieure à celle du produit parent. Toutefois, les données disponibles ne permettent pas de conclure sur l'absence de toxicité du THPI (EFSA, 2009).

2. Exposition alimentaire

Dans l'EAT2, seul le captane (et pas le THPI) a été mesuré. Il a été détecté dans 0.16% des 1234 échantillons alimentaires analysés, plus précisément dans 0.4% des échantillons de fruits (263 analyses au total). La contamination moyenne estimée est de 0.003 mg/kg selon l'hypothèse haute du modèle pour les fruits. L'exposition au captane est estimée à 1% de la DJA pour les adultes (18 ans et plus) et 1.4% de la DJA pour les enfants (3-17 ans).

Dans l'EATi, les données de contamination alimentaire sont exprimées en équivalent captane, correspondant au captane et au THPI. Ainsi, le captane a été détecté dans 18% des échantillons de céréales infantiles (sur 17 échantillons analysés), 33% des échantillons de desserts lactés infantiles (sur 6 échantillons analysés), 75% des échantillons de jus de fruits infantiles (sur 4 échantillons analysés), 9% des échantillons de potages et purées infantiles (sur 11 échantillons analysés), 73% des échantillons de pots de fruits infantiles (sur 30 échantillons analysés), 4% des échantillons de pots de légumes infantiles (sur 27 échantillons analysés), 2% des échantillons de pots de fruits infantiles (sur 45 échantillons analysés).

Les teneurs mesurées varient entre 0,9 et 9,9 µg/kg d'équivalent captane dans des pots de fruits. Ces concentrations restent inférieures à la LMR de 10 µg/kg, spécifique des aliments infantiles (Directive 2006/125/CE).

L'Anses estime à environ 0.35 µg/kg/j l'exposition moyenne des enfants au captane entre 0 et 36 mois (selon l'hypothèse haute), la DJA étant de 100 µg/kg/j. Il fait partie des 11 pesticides les plus détectés dans cette étude EATi.

Aucun dépassement de la DJA n'est observé pour le captane dans la population étudiée, pour l'hypothèse la plus haute, le 90^{ème} centile d'exposition atteint 0.6% de la DJA pour les enfants de 1-4 mois. Cela signifie que sur la base des connaissances actuelles et des données disponibles, l'exposition alimentaire de la population infantile au captane est jugée acceptable en France.

C. Chlorpyrifos éthyl

1. Caractéristiques physico-chimiques et toxicologiques

Le chlorpyrifos éthyl est un insecticide de la classe des organophosphorés, son mode d'action consiste en l'inhibition de l'acétylcholine estérase, c'est donc un neurotoxique à large spectre, étendu bien au-delà de la classe des insectes, dû à l'homologie remarquable de l'acétylcholine estérase dans le règne animal. Il est approuvé par l'Anses pour un seul produit phytosanitaire : le Pyristar® autorisé uniquement dans la culture des épinards en France. (Anses, *Chlorpyrifos*, 2019).

Les organophosphorés sont une classe d'insecticides qui ont été très utilisés par le passé, notamment dans la lutte contre les moustiques dans le but d'enrayer certaines maladies humaines vectorisées, comme le paludisme.

Ils ont également été utilisés en médecine vétérinaire mais ont été interdits, d'abord chez les animaux de production puis, chez les animaux de compagnie.

On peut également noter que de nombreuses molécules de cette famille sont utilisées comme gaz de combat (e.g. le sarin).

Le chlorpyrifos éthyl a une solubilité dans l'eau de 1.05 mg/L à 20°C – indépendamment du pH, son coefficient de partage octanol/eau est de 4.7 à 20°C et au pH de 7 (Agritox, *Chlorpyrifos-ethyl*, 2015).

Les caractéristiques toxicocinétiques du chlorpyrifos éthyl ont été évaluées chez le rat, après une administration orale : son absorption est rapide et quasiment complète (84-93 %). Son accumulation est faible. Il est largement distribué dans l'organisme. Son élimination est quasiment complète et atteint 80 % 48h après l'administration. Il est majoritairement éliminé dans les urines sous forme de trichloropyridinol, qui est le métabolite majoritaire du chlorpyrifos. Son métabolisme est modéré et met en jeu des réactions d'oxydation (oxon) et d'hydrolyse (Agritox, *Chlorpyrifos-ethyl*, 2015).

Les études toxicologiques ont permis de définir les repères toxicologiques suivants (Agritox, *Chlorpyrifos-ethyl*, 2015) :

- DJA : 1 µg/kg/j
- NOAEL subchronique (90 j) : 1 mg/kg/j chez le rat et le chien ; 0.5 mg/kg/j chez l'homme
- Toxicité aiguë VO : DL50 rat : 66-195 mg/kg
- ARfD : 0.005 mg/kg

2. Exposition alimentaire

Dans l'EAT2, le chlorpyrifos éthyl a été détecté dans 3.4% des 1235 échantillons alimentaires analysés, le chlorpyrifos éthyl a été détecté dans 2.5% des échantillons de charcuterie (sur 80 analysés), dans 48% des échantillons des fruits (sur 75 analysés) et dans 1.5% des échantillons de légumes (sur 267 analysés). L'exposition au chlorpyrifos éthyl est estimée à 1.4% de la DJA pour les adultes (18 ans et plus) et 1.5% de la DJA pour les enfants (3-17ans).

Le chlorpyrifos éthyl a été considéré par l'Anses comme une substance active prioritaire en 2006 compte tenu de son inscription à la liste du GEMS-Food (Global Environment Monitoring System) dans le cadre d'un programme visant à évaluer la contamination alimentaire et mis en place par l'OMS (WHO 2002).

Dans l'EATi, le chlorpyrifos éthyl a été détecté dans 2.6 % des 309 échantillons alimentaires analysés, destinés à la population infantile. Le chlorpyrifos éthyl a été détecté dans 13% des échantillons de boissons lactées infantiles (sur 8 échantillons analysés), dans 10% des échantillons de pots de fruits infantiles (sur 30 échantillons analysés) et dans 7% des échantillons de pots de légumes infantiles (sur 27 échantillons analysés).

L'Anses estime à environ 0.11 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$ (selon l'hypothèse haute) l'exposition moyenne des enfants entre 0 et 36 mois au chlorpyrifos éthyl, la DJA étant de $1\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$.

D. Méthyl-thiophanate

1. Caractéristiques physico-chimiques et toxicologiques

Le méthyl-thiophanate est un fongicide à spectre large de la classe des carbamate benzimidazole, son mode d'action est celui des benzimidazole, il inhibe la polymérisation/dépolymérisation de la tubuline et notamment la mitose des cellules eucaryotes. Il est approuvé par l'Anses et on peut le retrouver dans quatre produits phytosanitaires autorisés en France, dont un disponible pour les non-professionnels (Anses, *Thiophanate-methyl*, 2019). Il est considéré comme mutagène de catégorie 1B et reprotoxique de catégorie 1B selon le règlement (CE) n°1272/2008, il est également inscrit à la liste de la Commission européenne relative aux perturbateurs endocriniens de catégorie 2.

Le méthyl-thiophanate a une solubilité dans l'eau de 0.02 g/L à 25°C et au pH de 4 à 7.5, son coefficient de partage octanol/eau est de 1.45 au pH de 4 à 7, sa stabilité dans l'eau dépend grandement du pH, son $t_{1/2}$ pour l'hydrolyse est supérieur à 365 j à 25°C au pH de 5, supérieur à 36 j à 25°C au pH de 7 et de 0.7 j à 25°C au pH de 9. Son $t_{1/2}$ pour la photolyse dans l'eau est de 2.2 j au pH de 5, son pKa est de 7.28 à 25°C (Agritox, *Thiophanate-methyl*, 2005).

Les caractéristiques toxicocinétiques du méthyl-thiophanate ont été déterminées chez le rat, après une administration orale à faible dose. Son absorption est rapide (en 96h) et de 70 %. Il ne s'accumule pas et est largement distribué. Son élimination est rapide, à hauteur de 70% en 96h, 70% de cette élimination se fait par les urines et 30% par les fèces. Il est largement métabolisé (71 à 88%) en ses principaux métabolites, le 5-OH-carbendazime_sulfate, le 5-OH-carbendazime, le 4-OH-thiophanate méthyl et le carbendazime (Agritox, *Thiophanate-methyl*, 2005).

Les études toxicologiques ont permis de définir les repères toxicologiques suivants (Agritox, *Thiophanate-methyl*, 2005) :

- DJA : 80 µg/kg/j
- NOAEL subchronique (90 j) : 95-110 mg/kg/j chez le rat ; 50 mg/kg/j chez le chien
- Toxicité aiguë VO : DL50 rat : > 5000 mg/kg
- ARfD : 0.2 mg/kg

2. Exposition alimentaire

Dans les études de l'Alimentation menées par l'ANSES (EAT2 et EATi), la contamination des aliments par le méthyl-thiophanate a été considérée simultanément à celle du carbendazime, substance qui a été retirée du marché phytopharmaceutique en 2008 dans le cadre du plan national Ecophyto en France, mais qui reste utilisée en Europe en tant que biocide. Le carbendazime est un métabolite du méthyl-thiophanate. On peut donc considérer que le carbendazime détecté provient essentiellement de la métabolisation du méthyl-thiophanate et de la contamination des eaux européennes (Casado, 2019). Dans ces études sur l'alimentation, la définition du résidu pour l'évaluation du risque est la somme du carbendazime et du thiophanate-méthyl exprimée en carbendazime. Un facteur d'équivalence toxicologique de 0,25 est appliqué pour le thiophanate-méthyl (EFSA, 2009), la DJA du méthyl-thiophanate étant 4 fois supérieure à celle du carbendazime.

Le carbendazime a été détecté dans 1.3% des 1143 échantillons alimentaires analysés dans l'EAT2 et fait partie des 11 substances les plus détectées dans cette étude EAT2. L'exposition au carbendazime est estimée à 0.6% de la DJA pour les adultes (18 ans et plus) et 0.9% de la DJA pour les enfants (3-17 ans).

Dans l'EATi, le carbendazime a été détecté dans 75% des échantillons de jus de fruits infantiles (sur 4 échantillons analysés), dans 87% des échantillons de pots de fruits infantiles (sur 30 échantillons analysés), dans 33% des échantillons des biscuits sucrés ou salés (sur 3 échantillons analysés), dans 100% des échantillons de compotes et fruits cuits (sur 2 échantillons analysés), dans 0.076% des échantillons d'eau (sur 9153 échantillons analysés dans la base SISE-eaux), dans 33% des échantillons de fruits (sur 6 échantillons analysés) et dans 36.4% des échantillons de légumes (hors pommes de terre) (sur 11 échantillons analysés).

L'exposition moyenne au carbendazime est estimée à environ 0.2 µg/kg/j pour les enfants de 0-36 mois, la DJA du carbendazime étant de 20 µg/kg/j.

E. Thiaclopride

1. Caractéristiques physico-chimiques et toxicologiques

Le thiaclopride est un insecticide organochloré de la classe des néonicotinoïdes, c'est un cholinomimétique direct, il entre donc en compétition avec l'acétylcholine pour la liaison avec les récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine, il a donc des effets neurotoxiques. Il est approuvé par l'Anses et on peut le retrouver dans treize produits phytosanitaires autorisés en France (Anses, *Thiacloprid*, 2019).

Le thiaclopride a une solubilité dans l'eau de 184-186 mg/L à 20°C et au pH de 4 à 9. Son coefficient de partage octanol/eau est de 1.26 à 20°C. Il est stable dans l'eau à 25°C et au pH de 5 à 9. La demi-vie pour la photolyse est de 80 j au pH de 7, sous irradiation continue sous lampe Xenon (Agritox, *Thiacloprid*, 2018).

Les caractéristiques toxicocinétiques du thiaclopride ont été évaluées chez le rat, après une administration orale. Son absorption est rapide et quasi complète (95 %), il ne s'accumule pas et est largement distribué. Il est éliminé à hauteur de 53% en 24h, deux tiers de cette élimination se fait par les urines. Il est largement métabolisé par oxydation, hydroxylation, ouverture du cycle thiazolidine et conjugaison (Agritox, *Thiacloprid*, 2018).

Les études toxicologiques ont permis de définir les repères toxicologiques suivants (Agritox, *Thiacloprid*, 2018) :

- DJA : 10 µg/kg/j
- NOAEL subchronique (90 j) : 7.3-7.6 mg/kg/j chez le rat
- Toxicité aiguë VO : DL50 rat > 56 mg/kg
- ARfD : 0.03 mg/kg

2. Exposition alimentaire

Le thiaclopride a été détecté dans 7,4% des 296 échantillons analysés dans l'EATi, en particulier dans 2 échantillons de jus de fruits infantiles sur 4, dans 20 échantillons de pots de fruits infantiles sur 30.

L'Anses estime à environ 0.07 µg/kg/j (selon l'hypothèse haute) l'exposition moyenne au thiaclopride des enfants entre 0 et 36 mois, la DJA étant de 10 µg/kg/j.

F. Zirame

1. Caractéristiques physico-chimiques et toxicologiques

Le zirame est un fongicide de la classe des zinc-diméthyl-dithiocarbamate. Son mode d'action consiste en l'inhibition des systèmes enzymatiques métal-dépendants à groupe sulfhydrile. Il est approuvé par l'Anses et on peut le retrouver dans trois produits phytosanitaires autorisés en France (Anses, *Ziram*, 2019).

Le zirame est inscrit sur la liste prioritaire de la Commission européenne relative aux perturbateurs endocriniens de catégorie 2 (*European Commission 2013a, 2015a, INERIS 2005*). Il est également classé « toxique pour certains organes cibles suite à une exposition répétée » (STOT RE 2, H373).

Le zirame a une solubilité dans l'eau de 0.967 mg/L à 20°C, son coefficient de partage octanol/eau est de 1.65, il est peu stable dans l'eau avec des demi-vies d'hydrolyse de 0.17 h à 25°C au pH de 5, de 17.7 h à 25°C au pH de 7 et de 6.3 j à 25°C au pH de 9. Le temps de demi-vie de photolyse est de 0.36 j au pH de 9 à 25°C (Agritox, *Zirame*, 2019).

Les caractéristiques toxicocinétiques du zirame ont été évaluées chez le rat, après une administration orale : son absorption est rapide, de 59 % en 24h, il est largement distribué et s'accumule dans les tissus, son temps de demi-vie étant supérieur à 24h. Son élimination est donc lente, 64 à 85% de la dose absorbée est éliminée en 168h via l'air expiré principalement (42-60%), l'urine (16-21%) et les fèces (3%). Il est largement métabolisé en acide dithiocarbamique, lui-même transformé en CS₂ (disulfure de carbone) ou conjugué. Le thirame est également formé en faible quantité (Agritox, *Zirame*, 2019). Ce produit de dégradation est considéré plus toxique que la molécule parente et est désormais interdit en UE (09/10/2018).

Les études toxicologiques ont permis de définir les repères toxicologiques suivants (Agritox, *Zirame*, 2019) :

- DJA : 6 µg/kg/j
- NOAEL subchronique (90 j) : 3 mg/kg/j chez le rat ; 4.07 mg/kg/j chez le rat
- Toxicité aiguë VO : DL50 rat : 267 mg/kg
- ARfD : 0.08 mg/kg

2. Exposition alimentaire

Dans les études alimentaires menées par l'Anses, le ziram est inclus dans le groupe des dithiocarbamates. Pour ce groupe, l'exposition moyenne des enfants entre 0 et 36 mois est de 0.115 µg/kg/j, la DJA pour le ziram étant de 6 µg/kg/j.

Les dithiocarbamates sont détectés exclusivement dans les légumes (hors pommes de terre) dans 18.2% des 11 échantillons analysés ce qui représente 1.2% des 168 échantillons analysés au total.

G. Synthèse des caractéristiques des 6 pesticides

Les tableaux 2 et 3 synthétisent les principales caractéristiques des six pesticides inclus dans cette étude.

| Molécule | Boscalide | Captane | Chlorpyrifos éthyl | Méthyl-thiophanate | Thiaclopride | Zirame |
|--|---|------------------------|-------------------------------|--------------------------------|----------------------|-------------------------------------|
| Cible | Fongicide | Fongicide | Insecticide | Fongicide | Insecticide | Fongicide |
| Classe | Carboxine | Phtalimide | Organophosphoré | Carbamate benzimidazole | Néonicotinoïde | Zinc-diméthyl-dithiocarbamate |
| Mode d'action | Inhibition de la succinate déshydrogénase | Inhibition respiration | Inhibiteur de l'Ach estérase | Inhibiteur du fuseau mitotique | Compétiteur de l'Ach | Inhibiteur de systèmes enzymatiques |
| LogP | 2.96 | 2.57 | 4.7 | 1.45 | 1.26 | 1.65 |
| Masse molaire (g/mol) | 343,2 | 300.6 | 350.6 | 342.4 | 252.7 | 305.8 |
| Élimination (vitesse) | ND | Rapide | 48h | 96h | 24h | Lente (>168h) |
| Élimination (excrétat) | Fèces (80%) | ND | Urine (majoritairement) | Urine (70%) | Urine (53-66%) | Air expiré (42-60%) |
| DJA (µg/kg/j) | 40 | 100 | 1 | 80 | 10 | 6 |
| NOAEL subchronique (90j) (mg/kg/j) | 34-40 rat 7.6-8.1 chien | 60 chien | 1 rat 1 chien 0.5 homme | 95-110 rat 50 chien | 7.3-7.6 rat | 3 rat 4.07 chien |
| Toxicité aiguë par VO (DL50 rat en mg/kg) | > 5000 | > 2000 | 66-195 | > 5000 | > 56 | 267 |
| ARfD (mg/kg) | Non pertinent | 0.3 | 0.005 | 0.2 | 0.03 | 0.08 |

Tableau 2 : Principales propriétés chimiques, toxicologiques et repères toxicologiques de référence des six pesticides. ND : non déterminé

| Molécules | Classification toxicologique (CE) | Exposition moyenne estimée (pour les 0-36 mois) ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$) et % de la DJA (0-36 mois) | % de la DJA pour les adultes (18 ans et plus) et les enfants (3 à 17 ans) | Principaux aliments contaminés |
|--------------------|--|---|---|---|
| Boscalide | Très toxique pour les organismes aquatiques, peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique (N-R50/53) (France, 2004) | 0.11 0.275% | ND | Légumes, fruits, produits lactés |
| Captane | Cancérogène de catégorie 2 | 0.35 0.35% | 1% 1.4% | Fruits, légumes, céréales, produits lactés |
| Chlorpyrifos éthyl | Toxique en cas d'ingestion. Très toxique pour les organismes aquatiques, peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique. (N-R25 N-R50/53) (France, 2004) | 0.11 11% | 1.4% 1.5% | Fruits, légumes, charcuterie, produits lactés |
| Méthyl-thiophanate | Mutagène de catégorie 1B, Reprotoxique de catégorie 1B, Perturbateur endocrinien de catégorie 2 | 0.2 (Carbendazime) 1% (Carbendazime) | 0.6% 0.9% | Fruits, légumes, eaux (Carbendazime) |
| Thiaclopride | Nocif en cas d'ingestion. Nocif par inhalation. (H302-H332) (France, 2004) | 0.07 0.7% | ND | Fruits |
| Zirame | Perturbateurs endocriniens catégorie 2, (STOT RE2 H373) | 0.11 1.8% | ND | Légumes |

Tableau 3 : Classification toxicologique et exposition moyenne alimentaire par rapport à la DJA, estimée en France dans les EAT2 et EATi dans la population infantile et générale et principaux aliments contributeurs pour les 6 pesticides de l'étude. ND : non déterminé

II. Etude expérimentale : disposition des 6 pesticides dans l'unité materno-foetoplacentaire sur le modèle de brebis gravide

A. Matériels et méthodes

Cette étude a été déclarée au comité régional d'Ethique Toxcomethique (C2EA n°86) et au Ministère de la Recherche. Elle a été autorisée par le ministère de la Recherche sous le numéro #18501_2019011611094407.

1. Système biologique

Notre objectif était de déterminer les paramètres toxicocinétiques caractérisant les échanges materno-fœtal et fœto-maternel des différents pesticides du mélange.

L'étude a été réalisée sur 7 brebis Romane dont le fœtus a été préalablement instrumenté avec un cathéter jugulaire pour l'administration du mélange de pesticides, un cathéter carotidien pour les prélèvements sanguins et un cathéter dans la cavité amniotique. Les brebis provenaient de l'INRA, Domaine de Langlade à Pompertuzat. Les sept brebis ont été inséminées le 4 juillet 2018 et étaient entre 124-128 jours de gestation au moment des chirurgies (5-9 novembre 2018) et à 131 et 135 jours au moment de l'étude (12 et 16 novembre 2018).

Après la chirurgie, les brebis ont été placées dans des boxes individuels sur de la paille renouvelée quotidiennement et ont reçu une ration d'aliment concentré. Le fourrage et l'eau étaient distribués à volonté.

L'expérience a été divisée en deux périodes, séparées d'une semaine. Au cours de la première période, la mère a reçu une administration intraveineuse lente du mélange de 6 pesticides. Au cours de la seconde période, le fœtus a reçu une administration intraveineuse lente du même mélange. Le décours temporel des concentrations plasmatiques maternelles et fœtales et dans le liquide amniotique des 6 pesticides a été évalué afin de déterminer les paramètres toxicocinétiques du mélange de pesticides pour chaque couple mère-fœtus.

2. Méthodologie expérimentale

a. Détermination des doses à administrer : études préliminaires

Une étude préliminaire a été réalisée sur une brebis vide, préalablement à l'étude expérimentale afin de déterminer les doses des 6 pesticides à administrer par voie intraveineuse, sans effet néfaste aigu et permettant de suivre sur un temps suffisamment long la décroissance des concentrations plasmatiques pour déterminer les paramètres toxicocinétiques.

La solution d'administration contenant les pesticides a été préparée dans 7 mL DMSO pur. Les doses testées étaient de 0.94 mg/kg pour le boscalide, 0.25 mg/kg pour le chlorpyrifos éthyl ; 0.48 mg/kg pour le méthyl-thiophanate ; 2.87 mg/kg pour le captane ; 0.2 mg/kg pour le thiaclopride. Le zirame n'a pas été administré. Le décours temporel des concentrations plasmatiques maternelles est présenté dans le tableau 4. C'est le métabolite du captane (THPI) qui a été dosé et non le produit parent.

| Dose (mg/kg) | 0.94 | 0.25 | 0.48 | 2.87 | 0.2 |
|--|----------|--------------|--------------------|---------------|-------------|
| Concentrations plasmatiques $\mu\text{g/mL}$ | Boscalid | Chlorpyrifos | Méthyl-thiophanate | Captam (THPI) | Thiacloprid |
| Temps (h) | | | | | |
| Avant administration | | | < LOD | < LOD | < LOD |
| 0.008 | 0.55 | 0.08 | 0.55 | 4.37 | 2.181 |
| 0.025 | 0.63 | 0.04 | 0.69 | 5.31 | 2.483 |
| 0.108 | 0.56 | 0.03 | 0.77 | 4.29 | 2.379 |
| 0.258 | 0.33 | 0.02 | 0.54 | 5.66 | 2.309 |
| 0.508 | 0.14 | LOD | 0.32 | 3 | 1.318 |
| 0.725 | 0.19 | | 0.47 | 5.11 | 2.092 |
| 1.075 | 0.13 | | 0.33 | 4.62 | 1.708 |
| 1.825 | 0.06 | | 0.23 | 3.26 | 1.494 |
| 2.325 | 0.06 | | 0.21 | 3.62 | 1.539 |
| 3.325 | 0.02 | | 0.14 | 3.16 | 1.288 |
| 5.042 | 0.01 | | 0.09 | 2.82 | 1.13 |
| 6.708 | LOD | | 0.07 | 2.77 | 1.102 |
| 9.058 | | | 0.04 | 1.91 | 0.678 |
| 24.025 | | | LOD | LOD | 0.298 |
| 47.008 | | | | | 0.031 |
| 71.692 | | | | | LOD |

Tableau 4 : Cinétique de décroissance des concentrations plasmatiques ($\mu\text{g/mL}$) de 5 pesticides après une administration intraveineuse à une brebis des 5 pesticides en cocktail

Avec les doses utilisées et les LOD du dosage (cf infra), la décroissance des concentrations plasmatiques a pu être suivie pendant 5 à 9 h pour 3 pesticides (boscalide, méthyl-thiophanate et captane) et 47 h pour le thiaclopride. En revanche, la décroissance des concentrations plasmatiques du chlorpyrifos est très rapide et ne peut être suivie que pendant 20 min.

Ainsi, compte tenu de l'élimination relativement rapide de ces pesticides, excepté le thiaclopride chez la brebis et de la LOD élevée (0.01µg/mL), des doses choisies étaient relativement élevées (100 fois la DJA), et même 1000 fois la DJA pour le chlorpyrifos (Tableau 5). C'est la raison pour laquelle il était impératif de réaliser au préalable des essais de dilution des substances et de toxicité après administration à une brebis vide.

| Molécule | Boscalide | Captane | Chlorpyrifos éthyl | Méthyl- thiophanate | Thiaclopride | Zirame |
|---|-----------|---------|-----------------------|------------------------|--------------|--------|
| DJA (µg/kg/j) | 40 | 100 | 1 | 80 | 10 | 6 |
| Dose proposée (mg/kg) | 4 | 10 | 1 | 8 | 1 | 0,6 |
| Rapport Dose/DJA | 100 | 100 | 1000 | 100 | 100 | 100 |

Tableau 5 : Doses des 6 pesticides, sélectionnées a priori, pour évaluer les paramètres toxicocinétiques et que le mélange soit proportionnel à la DJA (facteur 100) (sauf pour le chlorpyrifos, facteur 1000)

➤ *Essais de dilution des pesticides dans le DMSO*

Un premier essai de dilution dans le DMSO, a été réalisé (9/11/2018) avec les six pesticides aux concentrations suivantes : **Solution 1** : boscalide 40 mg/mL ; chlorpyrifos 10 mg/mL ; zirame 6 mg/mL ; captane 100 mg/mL ; thiaclopride 10 mg/mL et méthyl-thiophanate 80 mg/mL. Mais le captane n'a pas été solubilisé dans le DMSO à la concentration de 100 mg/mL. Il est soluble à la concentration de 50 mg/mL.

Un nouvel essai de dilution a alors été réalisé avec les six pesticides aux concentrations suivantes : **Solution 2** : boscalide 40 mg/mL ; chlorpyrifos (10 mg/mL) ; zirame 6 mg/mL ; captane 50 mg/mL ; thiaclopride 10 mg/mL et méthyl-thiophanate 80 mg/mL. Ces pesticides en mélange sont solubles dans le DMSO à ces concentrations.

➤ *Vérification de l'absence de précipitation du mélange ex vivo dans le plasma*

L'addition d'un volume de 8 µl de cette solution (boscalide 40 mg/mL ; chlorpyrifos (10 mg/mL) ; zirame 6 mg/mL ; captane 50 mg/mL ; thiaclopride 10 mg/mL et méthyl-thiophanate 80 mg/mL) à 15 ml de plasma (rapport 1/300 pour un volume de plasma de 30 mL/kg) a entraîné la formation d'un précipité. Des essais de dilution dans le plasma de chaque solution de pesticide dans le DMSO a montré que c'est la solution de Boscalide qui précipite dans le plasma. La concentration de boscalide a donc été diminuée de 40 à 10 mg/mL.

Une nouvelle **solution 3** des 6 pesticides a alors été préparée : boscalide 10 mg/mL ; chlorpyrifos 10 mg/mL ; zirame 6 mg/mL ; captane 50 mg/mL ; thiaclopride 10 mg/mL et méthyl-thiophanate 80 mg/mL.

Ce mélange précipitait de manière modérée et temporaire dans le plasma.

➤ *Essai d'administration du mélange à une brebis vide*

Ce mélange a été administré à une brebis vide pour évaluer une éventuelle toxicité aiguë du mélange administré par voie intraveineuse. Avant l'administration, une légère reprécipitation du mélange dans la seringue avait été observée, ce qui indiquait qu'il était impératif de maintenir les seringues à 20°C jusqu'à l'administration.

L'administration intraveineuse a été réalisée sur 1 min environ. La brebis a présenté des tremblements de la tête suite à l'administration. Pour limiter ces effets toxiques aigus, qui pourraient être liés au chlorpyrifos, toutes les doses de pesticides ont été diminuées. Elles correspondent à 50 fois la DJA, excepté le boscalide (25 ×) et le chlorpyrifos (500× la DJA, Tableau 6).

| | Boscalide | Chlorpyrifos éthyl | Zirame | Captane | Thiaclopride | Méthyl- thiophanate |
|-----------------------------|------------------|-----------------------|--------|---------|--------------|--|
| ARFD (mg/kg) | Non pertinent | 0.005 | 0.08 | 0.3 | 0.03 | 0.2 (NOAEL 20 mg/kg/j VO lapin) |
| DJA (mg/kg/j) | 0.04 | 0.001 | 0.006 | 0.1 | 0.01 | 0.08 |
| Dose utilisée (mg/kg) | 1 | 0.5 | 0.3 | 5 | 0.5 | 4 |
| Dose/DJA | 25 | 500 | 50 | 50 | 50 | 50 |

Tableau 6 : Doses de pesticides choisies pour l'étude toxicocinétique, compte tenu de la toxicité du mélange et de la solubilité des pesticides dans le DMSO

b. Préparation des solutions de pesticides

Pour la première période (administration maternelle des pesticides), le poids des brebis a été évalué dans les 3 jours qui précédaient l'administration maternelle.

La solution de pesticides a été préparée extemporanément dans 100 % de DMSO (Tableau 7). Le volume de DMSO utilisé pour l'administration était de 0.1 ml/ kg, soit 8 mL de DMSO pour une brebis de 80 kg, ce qui est conforme aux recommandations de Neervannan (2006). La solution a été répartie dans des seringues de 10 mL. Une seringue de DMSO de 0.5 ml a été utilisée pour rincer le cathéter après l'administration intraveineuse lente. Les seringues ont été maintenues à 20°C jusqu'à l'administration.

| | Boscalide | Chlorpyrifos éthyl | Zirame | Captane | Thiaclopride | Méthyl- thiophanate |
|--------------------------------------|-----------|-----------------------|--------|---------|--------------|------------------------|
| Dose utilisée (mg/kg) | 1 | 0.5 | 0.3 | 5 | 0.5 | 4 |
| Concentrations des solutions (mg/mL) | | | | | | |
| mg/mL | 10 | 5 | 3 | 50 | 5 | 40 |

Tableau 7 : Doses des pesticides administrées aux brebis et aux fœtus (poids du fœtus arbitrairement fixé à 3 kg) et concentrations des solutions correspondantes dans le DMSO

Pour la deuxième période (administration fœtale du mélange de pesticides), les concentrations des solutions à administrer ont été ajustées au poids du fœtus estimé à 3 kg en fin de gestation. Toutefois, les poids fœtaux et le nombre de fœtus ont été déterminés en fin d'expérience, et les doses réelles administrées ont varié de 57 à 108 % des doses théoriques (Tableau 8). Le volume de DMSO administré au fœtus était de 0.3 mL. Une seringue de DMSO de 0.1 ml a été utilisée pour rincer le cathéter après l'administration intraveineuse lente.

| | Nombre de fœtus | Poids du fœtus (kg) | Rapport dose réelle/dose théorique |
|----------------|-----------------|---------------------|------------------------------------|
| Fœtus brebis 1 | 1 | 2.79 | 108% |
| Fœtus brebis 2 | 3 | 5.28 | 57% |
| Fœtus brebis 3 | 2 | 3.62 | 83% |
| Fœtus brebis 4 | 2 | 4 | 75% |

Tableau 8 : Rapport des doses réelles et théoriques administrées aux fœtus cathétérisés et nombre de fœtus par portée

Afin d'éviter toute source de contamination ultérieure, l'ensemble de la préparation des solutions a été réalisé dans une pièce identifiée pour la préparation des solutions d'administration (Salle de pesée, Bat 8.2) et seul du matériel jetable a été utilisé. Un aliquot de 100 µL de la solution préparée a été conservé à -20°C.

c. Modalité d'administration et de collecte des échantillons

Les brebis ont été tondues au niveau des deux jugulaires avant la chirurgie. Les administrations maternelles lentes, sur une minute, du mélange de pesticides ont été réalisées via un cathéter (Intraflon®) mis en place dans la veine jugulaire gauche des brebis au cours de l'heure précédant les administrations.

Les administrations intraveineuses lentes, sur une minute, du mélange de pesticides chez le fœtus ont été réalisées via le cathéter jugulaire, 96h après les injections maternelles.

Les prélèvements sanguins fœtaux ont été réalisés via le cathéter mis à demeure dans l'artère carotidienne du fœtus. Les prélèvements de liquide amniotique ont été réalisés via le cathéter mis à demeure dans la cavité amniotique. Les prélèvements maternels ont été réalisés par ponction directe de la veine jugulaire droite.

Des prélèvements de sang maternel (3 mL) et fœtal (1 mL) ont été réalisés avant l'administration et après l'administration, à 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h et 24h, 48h, puis toutes les 24 h jusqu'à 96h (première période) et jusqu'à 168 h pour la deuxième période, afin de déterminer les paramètres toxicocinétiques du mélange de pesticides pour chaque couple mère-fœtus. Le liquide amniotique a été prélevé au cours de la première et de la deuxième période avant l'administration et 4 h, 10h et 24, 48, 96h (première période) et jusqu'à 168 h pour la deuxième période.

d. Modalités de traitement des échantillons sanguins et de liquide amniotique

Le sang fœtal et maternel a été recueilli dans des tubes en polypropylène de 1.5 mL héparinés avec 10 UI d'héparine (Héparine CHOAY). Le liquide amniotique a été recueilli dans des tubes en polypropylène de 1.5 mL

Les échantillons biologiques ont été maintenus dans de la glace tout au long de leur procédure de traitement.

Les plasmas et le liquide amniotique ont été centrifugés à 3000 g et à 4°C pendant 10 minutes, dans l'heure qui a suivi leur prélèvement. Les plasmas et les liquides amniotiques ont été répartis en deux fractions aliquotes (dont une fraction aliquote de 200 µL) conservées à -80°C.

3. Méthode de dosage des pesticides

Les dosages des pesticides ont été réalisés par chromatographie (UHPLC : chromatographie en phase liquide à ultra haute performance) couplée à de la spectrométrie de masse par l'équipe du Professeur Lynn Vanhaecke de l'Université de Ghent.

Pour chaque pesticide, une solution mère a été préparée dans du méthanol à une concentration de 1 mg/mL, sauf pour le zirame qui a été dilué dans le chloroforme à 1 mg/mL puis dans le méthanol à 100 µg/mL.

Les solutions filles avec les concentrations les plus basses (20 ng/µL et 1 ng/µL) ont été préparées dans de l'eau ultra-pure. Les autres solutions filles ont été préparées dans un mélange de solvant (20% de méthyl tert-butyl éther et 80% d'acétonitrile). L'étalon deutéré interne était l'atrazine-d₅.

Les pesticides ont été dosés par chromatographie (UHPLC : chromatographie en phase liquide à ultra haute performance), comprenant un système de pompe Ultimate 3000 XRS, couplé à une colonne (Ultimate 3000 RS) et à un échantillonneur automatique (Dionex, Amsterdam, Pays-Bas). Les pesticides ont été séparés par chromatographie en phase inverse avec un gradient d'éluion. La colonne utilisée était la colonne Waters Acquity HSS T3 (150 × 2,1 mm, 1,8 µm) à la température de 45 °C. La phase mobile était constituée d'un mélange d'eau et d'acétonitrile contenant chacun 0.1% d'acide formique et 0.05% d'acétate d'ammonium, injectée à un débit de 0.4 mL/min. Le volume injecté était de 10 µL.

La détection des pesticides était réalisée grâce à leur rapport masse sur charge et leur temps de rétention et leur profile isotopique, présentés dans le tableau 9.

| Composé | Polarité | Rapport masse sur charge (m/z) | Temps de rétention (min) |
|------------------------------|----------|--------------------------------|--------------------------|
| Thiaclopride | + | 253.03100 | 10.66 |
| Boscalide | + | 343.03994 | 12.07 |
| Méthyl-thiophanate | + | 343.05292 | 11.11 |
| THPI (métabolite du Captane) | + | 316.96756 | 11.91 |
| Chlorpyrifos éthyl | + | 349.93356 | 13.53 |
| Zirame | + | 119.99355 | 10.58 |
| Atrazine-d ₅ | + | 221.13253 | 11.59 |

Tableau 9 : Polarité, rapport masse sur charge et temps de rétention des six pesticides et de l'atrazine deutéré utilisé comme étalon interne

➤ Procédure d'extraction

La procédure d'extraction pour les plasmas fœtaux, maternels et le liquide amniotique a compris les étapes suivantes :

- Ajout de l'étalon interne (0,005 ng/µL) à 150 µl d'échantillon de plasma ou de liquide amniotique
- Précipitation des protéines avec le solvant MTBE / acétonitrile
- Évaporation du surnageant et reprise de l'échantillon, dans 60 µL d'eau ultrapure, qui sera ensuite injecté dans l'HPLC.

➤ Analyse

Les résultats ont été analysés en utilisant les gammes de calibration dans les matrices correspondantes (plasma maternel, fœtal ou liquide amniotique).

B. Analyse des données

Les profils individuels des concentrations plasmatiques maternelles et fœtales des six pesticides ont été analysés selon une approche non compartimentale à l'aide du logiciel Phoenix[®] NLME[™] (version 6.4; Pharsight, Mountain View, CA, USA).

Les doses de pesticides et les paramètres PK étaient normalisés par le poids du fœtus évalué à la fin de l'expérience.

L'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques de chaque pesticide de t=0 jusqu'au temps d'occurrence de la dernière concentration quantifiable (AUC_{0-Tlast}) a été calculée avec la méthode des trapèzes arithmétiques. L'aire sous la courbe des concentrations de chaque pesticides de t=0 jusqu'à l'infini (AUC_{inf}) a été calculé par extrapolation, en ajoutant à l'AUC_{0-tlast}, la dernière concentration mesurée divisée par la constante d'élimination. Cette partie extrapolée de l'AUC représente moins de 20 % de l'AUC_{inf}.

Les clairances maternelle et fœtale de chaque pesticide (Cl_{mpesticide} et Cl_{fpesticide}) ont été estimées respectivement après l'administration IV maternelle du mélange de pesticides et l'administration IV fœtale du mélange de pesticides en divisant la dose de chaque pesticide administrée par l'AUC correspondante :

$$Cl = \frac{F \times Dose}{AUC}$$
 où Cl est la clairance plasmatique, F le facteur de biodisponibilité, qui est égal à 1 pour une IV et AUC l'aire sous la courbe

Le volume de distribution à l'équilibre :
$$V_{ss} = \frac{Dose \times AUMC}{AUC^2}$$
 où AUMC est l'aire sous la courbe du moment ;

Le temps de résidence moyen :
$$MRT = \frac{AUMC}{AUC}$$

La fraction de la dose maternelle de chaque pesticide transférée au fœtus qui atteint la circulation fœtale (F_{mf pesticide}) a été calculée à partir de l'équation suivante :

$$F_{mf \text{ pesticide}} = AUC_{f \text{ pesticide}} \times Cl_{f \text{ pesticide}} / Dose_m \text{ pesticide}$$

Avec AUC_{f pesticide} : aire sous la courbe des concentrations plasmatiques fœtales de pesticide obtenues après l'administration maternelle de pesticide à la Dose_{m pesticide}.

La fraction de la dose de chaque pesticide administrée au fœtus qui a été transférée à la mère (F_{fm pesticide}) a été calculée à partir de l'équation suivante :

$$F_{fm \text{ pesticide}} = AUC_{m \text{ pesticide}} \times Cl_{m \text{ pesticide}} / Dose_f \text{ pesticide}$$

Avec AUC_{m pesticide} : aire sous la courbe des concentrations plasmatiques maternelles de pesticide obtenues après l'administration foetale du pesticide à la Dose_{f pesticide}.

Certaines valeurs de transfert placentaire n'ont pas pu être calculées lorsque le pesticide n'était pas détecté chez le fœtus lors de l'injection maternelle et chez la mère lors de l'injection fœtale.

Le passage fœto-maternel maximal a alors été estimé en prenant en compte une AUC dans le compartiment opposé à l'administration, calculée avec des concentrations plasmatiques égales à la LOD pendant 10 minutes après l'injection.

De la même façon, si les prélèvements fœtaux n'ont pas pu être obtenus lors de la deuxième période correspondant aux administrations fœtales (B1 et B6), le taux de transfert materno-fœtal a été calculé en prenant la clairance fœtale moyenne des 4 fœtus et l'AUC des concentrations plasmatiques fœtales après l'administration maternelle. Si la clairance maternelle n'a pas pu être déterminée (B3), le taux de transfert fœto-maternel a été calculé en prenant en compte la clairance maternelle moyenne sur 4 brebis.

III. Analyse des résultats et discussion

Les concentrations des six pesticides dans tous les échantillons plasmatiques maternels ou fœtaux ou de liquide amniotique, prélevés avant l'injection maternelle étaient inférieures à la LOD correspondante (Tableau 10).

Les concentrations en pesticides de plasmas maternel et fœtal et du liquide amniotique prélevés juste avant l'administration fœtale, réalisée 96 h environ après l'administration maternelle, étaient toutes inférieures aux LOD respectives pour chaque pesticide, excepté pour la brebis B2 et le thiaclopride, pour lequel la concentration était de 0,004 µg/mL. Cette valeur, proche de la LOD et plus élevée que la concentration de thiaclopride au temps 72 h a été considérée comme erronée et n'a pas été prise en compte dans les analyses.

| Molécules | Boscalide | THPI | Chlorpyrifos | Méthyl-thiophanate | Thiaclopride | Zirame |
|-------------|-----------|------|--------------|--------------------|--------------|--------|
| LOD (µg/mL) | 0.01 | 0.5 | 0.01 | 0.01 | 0.001 | 0.025 |

Tableau 10 : Valeurs des LOD de la méthode de dosage par UHPLC pour les six pesticides étudiés

L'expérience pour l'administration maternelle a été réalisée sur sept brebis gravides. Pour des raisons de coût, seuls les échantillons de 5 brebis ont été dosés. Les résultats d'une des cinq brebis (B3) ont été écartés car les valeurs semblaient incohérentes pour cette période, sans explication évidente. Ces échantillons seront dosés une nouvelle fois prochainement.

A. Boscalide

La figure 2 présente la décroissance temporelle (moyenne \pm ET) des concentrations plasmatiques maternelles (courbe bleue) et fœtales (courbe orange) de boscalide après une injection maternelle du mélange de six pesticides, à une dose de 1 mg/kg pour le boscalide.

Les concentrations dans le liquide amniotique pour le boscalide étaient inférieures à la LOD pour tous les prélèvements de liquide amniotique (à 4h, 10h, 24h puis toutes les 24h jusqu'à 96h).

Après l'administration maternelle, les concentrations plasmatiques maternelles de boscalide décroissent rapidement pour atteindre des valeurs inférieures à la LOD après environ 10h. Les concentrations plasmatiques fœtales décroissent également rapidement et atteignent un plateau 8h après l'injection environ, et ce plateau est maintenu pendant toute la durée des prélèvements, *i.e.*, 72h. Toutefois, il est à noter que les concentrations fœtales au-delà de 6 h après l'administration, ne correspondent qu'à un seul fœtus, les concentrations de boscalide étaient inférieures à la LOD pour les deux autres fœtus.

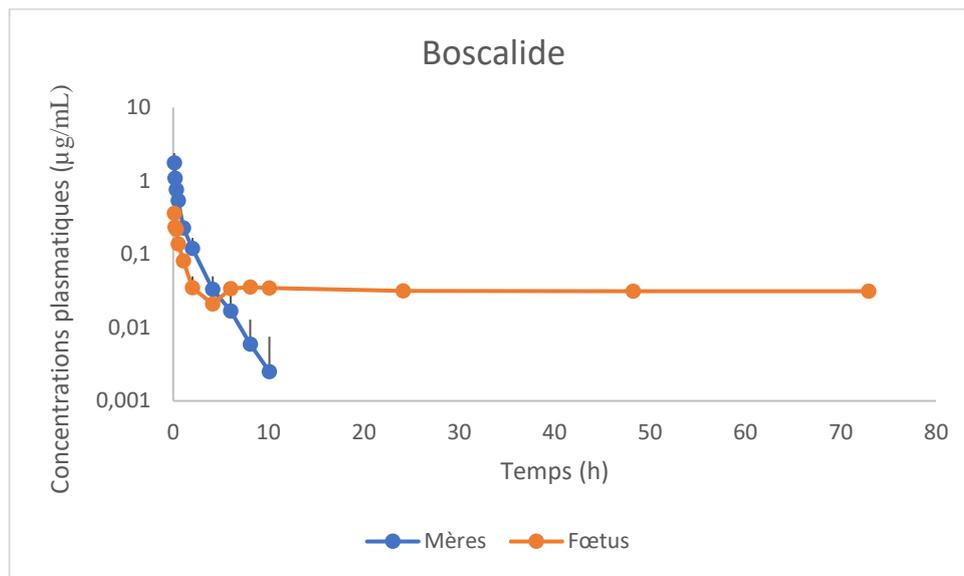


Figure 2 : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques maternelles (bleu) et fœtales (orange) moyennes (\pm ET) de boscalide après une injection IV de 1 mg/kg de boscalide à 4 brebis gravides.

Le boscalide est donc rapidement éliminé de la circulation maternelle en 10h mais passe dans le compartiment fœtal où il est également rapidement éliminé dans un premier temps. Mais, une persistance des concentrations de boscalide est observée (sur un fœtus), qui pourrait être liée à réactivation du métabolite glucuronide par des glucuronidases dans le compartiment fœtal, comme cela a déjà été montré pour d'autres contaminants alimentaires comme le bisphénol A (Gauderat et al, 2016).

Après une administration maternelle, l'exposition interne du fœtus au boscalide est de 3,1 à 6,6 fois inférieure à celle de sa mère (rapport des AUC).

La figure 3 présente l'évolution temporelle (moyenne \pm ET) des concentrations plasmatiques maternelles (courbe bleue) et fœtales (courbe orange) de boscalide après l'injection fœtale du mélange de six pesticides, à une dose de 1 mg/kg pour le boscalide.

Les concentrations dans le liquide amniotique pour le boscalide étaient inférieures à la LOD pour tous les prélèvements de liquide amniotique (à 4h, 10h, 24h puis toutes les 24h jusqu'à 168h). Les concentrations plasmatiques maternelles de boscalide décroissent rapidement pour atteindre des valeurs inférieures à la LOD environ 30 minutes après l'administration foetale. Les concentrations plasmatiques fœtales décroissent jusqu'à 4h après l'injection et sont ensuite inférieures à la LOD.

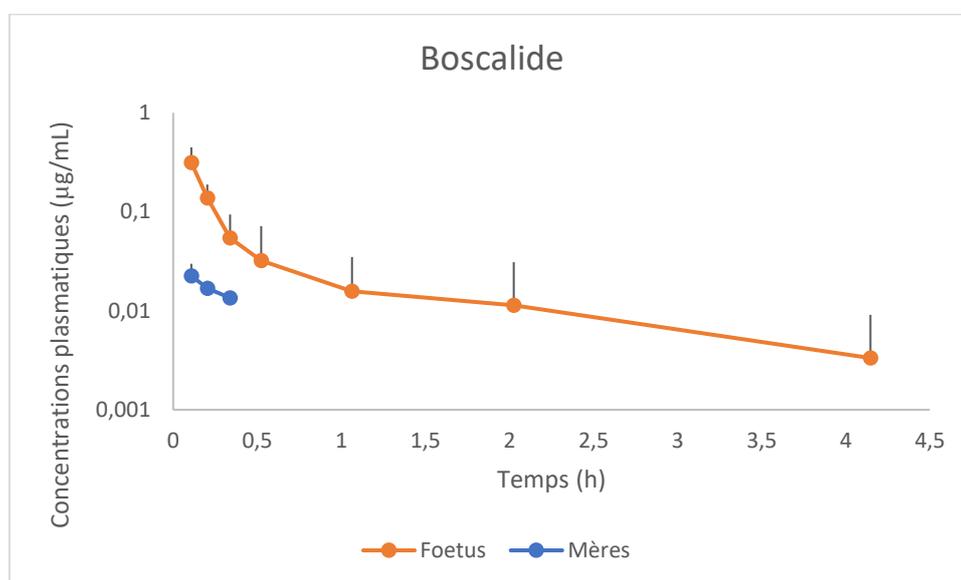


Figure 3 : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques maternelles (bleu) et fœtales (orange) moyennes (\pm ET) de boscalide après une injection IV de 1 mg/kg de boscalide à 3 fœtus cathétérisés.

Le boscalide passe donc la barrière placentaire dans le sens fœto-maternel, mais est éliminé très rapidement de la circulation maternelle et en 4h de la circulation fœtale.

Paramètres toxicocinétiques du boscalide

Dans le compartiment maternel, le boscalide est éliminé avec une clairance plasmatique maternelle moyenne de 814 ml/(kg.h), représentant environ 20 % du débit cardiaque. Sa demi-vie d'élimination est très courte, de 1.6 h (Tableau 11). Le volume de distribution de 888 mL/kg en moyenne est élevé, ce qui est cohérent avec la lipophilicité relativement élevée du boscalide (LogP=2.96).

Dans le compartiment fœtal, le boscalide est éliminé rapidement avec une clairance plasmatique de 5325 mL/(kg.h) et une demi-vie d'élimination plasmatique évaluée sur deux fœtus de 0.29 et 0.6 h (Tableau 11).

| Paramètres toxicocinétiques | Mère | | | | | | Fœtus | |
|-----------------------------|----------|----------|----------|----------|---------|------------|---------|---------|
| | Brebis 1 | Brebis 2 | Brebis 3 | Brebis 4 | Moyenne | Écart-type | Fœtus 1 | Fœtus 2 |
| Cl (mL/(h*kg)) | 901.59 | 1035.00 | 666.14 | 651.75 | 813.62 | 186.81 | 5322.90 | 5332.96 |
| V _{ss} (mL/kg) | 1038.96 | 690.64 | 1015.07 | 807.34 | 888.00 | 167.72 | 1913.85 | 4343.93 |
| MRT (h) | 1.15 | 0.67 | 1.52 | 1.24 | 1.15 | 0.36 | 0.20 | 0.68 |
| t _{1/2} (h) | 1.34 | 0.86 | 1.81 | 2.29 | 1.58 | 0.61 | 0.29 | 0.60 |

Tableau 11 : Principaux paramètres toxicocinétiques du boscalide chez 4 brebis gravides et 2 fœtus cathétérisés après une administration IV de boscalide à la dose de 1 mg/kg.

Transferts fœto-maternel et materno-fœtal du boscalide

7 % de la dose maternelle de boscalide est transféré au fœtus, ce qui signifie que le fœtus reçoit une dose rapportée à son poids environ deux fois supérieure à celle de sa mère. 17% de la dose fœtale est éliminée par passage placentaire (Figure 4).

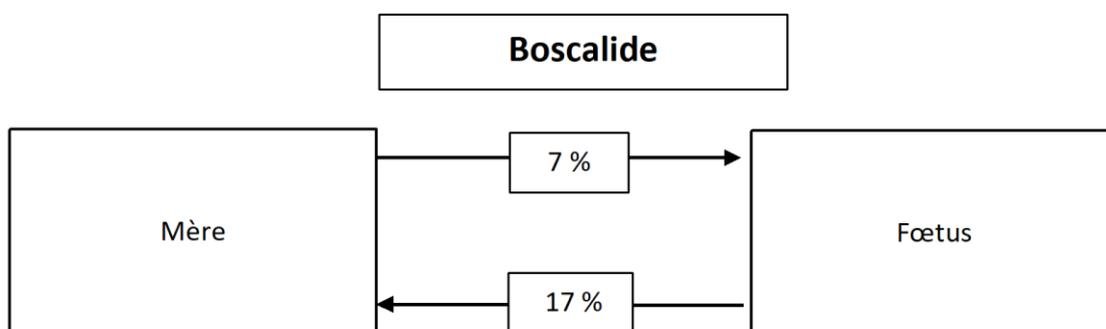


Figure 4 : Taux de transfert materno-fœtal (n=5) et fœto-maternel (n=3) moyens après une injection IV de boscalide (1 mg/kg) à des brebis gravides et leur fœtus cathétérisé.

En définitive le fœtus est exposé au boscalide via une exposition maternelle, mais il est capable de l'éliminer rapidement grâce à une clairance fœtale relativement élevée, placentaire et non-placentaire (17 %).

B. THPI (métabolite du Captane)

Dans notre étude, seul le métabolite du captane, le tétrahydrophthalimide (THPI), a été dosé et nous avons considéré que le captane est rapidement et totalement métabolisé en THPI. En effet, dans l'organisme, le captane est rapidement métabolisé en son principal métabolite, le tétrahydrophthalimide (THPI), dès son arrivée dans la circulation systémique (en 0.97 s) (Gordon et al., 2001).

La figure 5 présente l'évolution temporelle (moyenne \pm ET) des concentrations plasmatiques maternelles (courbe bleue) et fœtale (courbe orange) ainsi que des concentrations dans le liquide amniotique (courbe grise) du THPI (métabolite du captane) après une administration maternelle IV du mélange de six pesticides, à une dose de 5 mg/kg pour le captane.

Après l'administration maternelle, les concentrations plasmatiques maternelles de THPI décroissent jusqu'à atteindre des valeurs inférieures à la LOD après environ 24h. Les concentrations plasmatiques fœtales forment un plateau jusqu'à environ 10h, puis décroissent lentement jusqu'au dernier prélèvement, 72h après l'injection. Dans le liquide amniotique, les concentrations de THPI augmentent lentement durant les premières 48h puis diminuent lentement jusqu'au dernier prélèvement, 72h après l'injection.

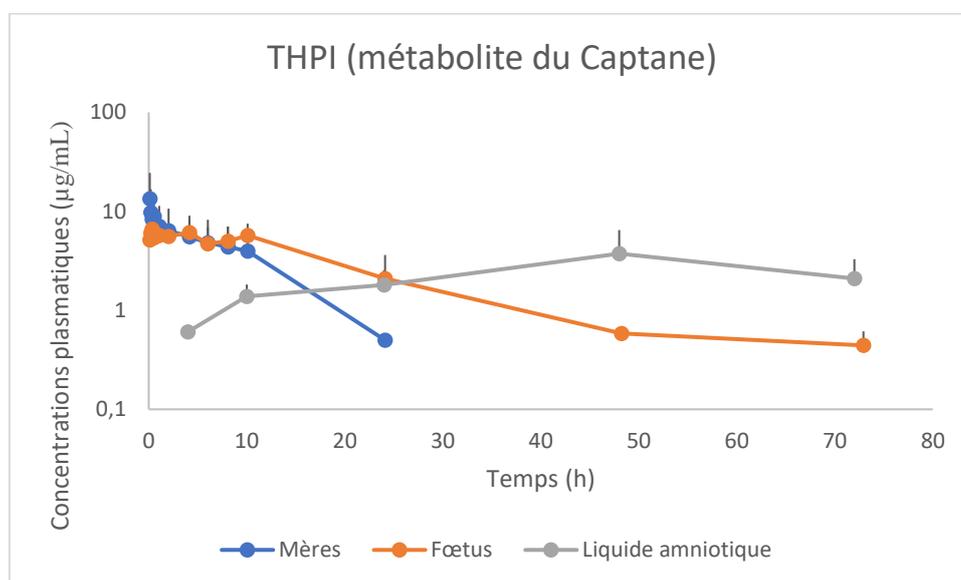


Figure 5 : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques maternelles (bleu) et fœtales (orange) et du liquide amniotique (gris) (moyennes \pm ET) de THPI (métabolite du captane) après une injection IV de 5 mg/kg de captane à 4 brebis gravides.

Le THPI est donc éliminé de la circulation maternelle au cours des premières 24 h. Le captane ou le THPI est capable de passer la barrière placentaire dans le sens materno-fœtal. Dans le compartiment fœtal, le THPI présente une première décroissance dans les 48h après l'administration maternelle. Cependant, le THPI persiste ensuite dans le compartiment fœtal, notamment dans le liquide amniotique, à des concentrations environ 5 à 7 fois supérieures aux concentrations plasmatiques fœtales, ce qui suggère que le THPI présent dans le liquide amniotique pourrait rejoindre la circulation fœtale. En effet, le fœtus en fin de gestation ingurgite environ 100 à 500 ml de liquide amniotique par jour (R. Harding et al., 1984), ce qui correspond à environ 400 à 1900 µg de THPI par jour, ce qui peut expliquer la persistance du THPI dans la circulation fœtale.

Après une administration maternelle, l'exposition interne du fœtus au THPI est 1,1 à 6,1 fois supérieure à celle de sa mère (rapport d'AUC).

La figure 6 présente l'évolution temporelle (moyenne ± ET) des concentrations fœtales (courbe orange) et des concentrations dans le liquide amniotique (courbe grise) du THPI (métabolite du captane) suite à l'injection fœtale IV du mélange de six pesticides, à une dose de 5 mg/kg pour le captane.

Après l'administration fœtale, les concentrations plasmatiques fœtales de THPI décroissent jusqu'à atteindre des valeurs inférieures à la LOD après environ 24h. Les profils de décroissance temporelle du THPI pour les deux fœtus après l'administration fœtale sont très différentes, ce qui rend difficile l'interprétation. Le THPI n'est pas détecté dans la circulation maternelle, excepté au temps 8 min sur une mère sur 3, ce qui suggère soit qu'il ne passe pas ou peu la barrière placentaire dans le sens fœto-maternel, soit qu'il est éliminé très rapidement de la circulation maternelle. Le THPI n'a été détecté dans le liquide amniotique que sur une brebis sur 2, à des niveaux élevés 1.34 µg/ml, pendant 20 min.

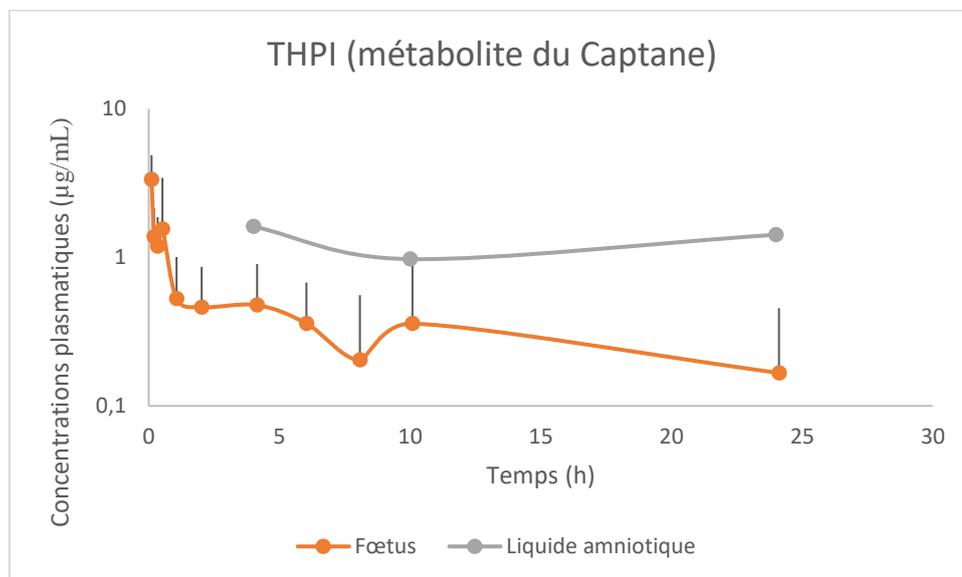


Figure 6 : Évolution temporelle des concentrations plasmatiques fœtales (orange, moyennes \pm ET) et du liquide amniotique (gris) (pour un seul fœtus) de THPI (métabolite du captane) après une injection IV de 5 mg/kg de captane à 3 fœtus cathétérisés.

Paramètres toxicocinétiques du captane

Dans le compartiment maternel, le THPI est faiblement éliminé avec une clairance plasmatique maternelle moyenne de 36.7 mL/kg.h, représentant environ 1 % du débit cardiaque. Sa demi-vie d'élimination est de 5.6 h (Tableau 12). Le volume de distribution, de 377 mL/kg en moyenne, est relativement élevé.

Les clairances plasmatiques fœtales ont été calculées avec les AUC0-last et pas avec les AUC0-inf, en raison de la difficulté à estimer la pente terminale. Ces clairances sont de 216 et 130 mL/(h.kg) pour les deux fœtus.

| Paramètres toxicocinétiques | Mère | | | | | | Fœtus | |
|-----------------------------|----------|----------|-----------|-----------|---------|------------|---------|---------|
| | Brebis 1 | Brebis 2 | Brebis 3* | Brebis 4* | Moyenne | Écart-type | Fœtus 1 | Fœtus 2 |
| Cl (mL/(h*kg)) | 67.49 | 41.05 | 19.62 | 18.49 | 36.66 | 23.03 | 215.75# | 130.20# |
| Vss (mL/kg) | 878.63 | 361.57 | 143.90 | 125.10 | 377.30 | 351.03 | ND | ND |
| MRT (h) | 13.02 | 8.81 | 7.34 | 6.77 | 8.98 | 2.83 | ND | ND |
| t _{1/2} (h) | 8.38 | 6.15 | 3.86 | 4.13 | 5.63 | 2.10 | ND | ND |

Tableau 12 : Principaux paramètres toxicocinétiques du THPI (métabolite du captane) chez 4 brebis gravides après une administration IV de captane (5 mg/kg) ; * pour les brebis 3 et 4 les premières valeurs dosées étaient hors gamme. Ces échantillons seront dosés après dilution. Les clairances plasmatiques fœtales ont été calculées avec les AUC0-last et pas avec les AUC0-inf, en raison de la difficulté à estimer la pente terminale.

Transferts fœto-maternel et materno-fœtal du captane

42 % de la dose maternelle de captane est transféré au fœtus, ce qui signifie que le fœtus reçoit une dose rapportée à son poids environ 11 fois supérieure à celle de sa mère.

La part de clairance placentaire fœto-maternelle n'a pas pu être évaluée. Elle a été estimée inférieure à 2 % (en prenant en compte une concentration maternelle maximale à la LOQ 10 min après l'administration fœtale). (Figure 7)

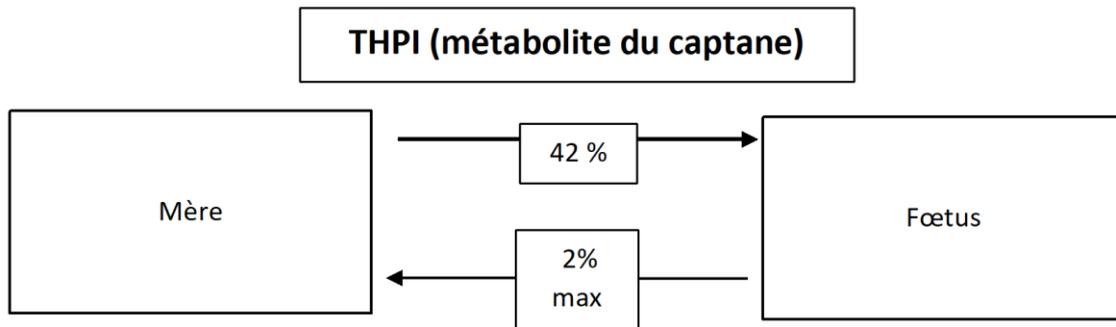


Figure 7 : Taux de transfert materno-fœtal (n=5) et fœto-maternel (n=3) moyens après une injection IV de captane (5 mg/kg) à des brebis gravides et à leur fœtus cathétérisé. Le transfert fœto-maternel du THPI n'a pas pu être calculé. Le taux de transfert fœto-maternel maximal a été estimé en considérant des concentrations maternelles en THPI au niveau de la LOQ pendant 10 min, après une administration fœtale de THPI.

En définitive, le fœtus est exposé au THPI via une exposition maternelle au captane, mais il est capable d'éliminer très rapidement le THPI en raison d'une clairance fœtale non-placentaire élevée.

C. Chlorpyrifos éthyl

La figure 8 présente la décroissance temporelle des concentrations plasmatiques maternelles moyenne (\pm ET) (courbe bleue) du chlorpyrifos après l'administration maternelle du mélange de six pesticides, à une dose de 0.5 mg/kg pour le chlorpyrifos.

Après l'administration maternelle, les concentrations plasmatiques maternelles de chlorpyrifos décroissent très rapidement pour atteindre des valeurs inférieures à la LOD environ 1h après l'administration. Le chlorpyrifos n'est pas détecté dans le compartiment fœtal, que ce soit le plasma ou le liquide amniotique.

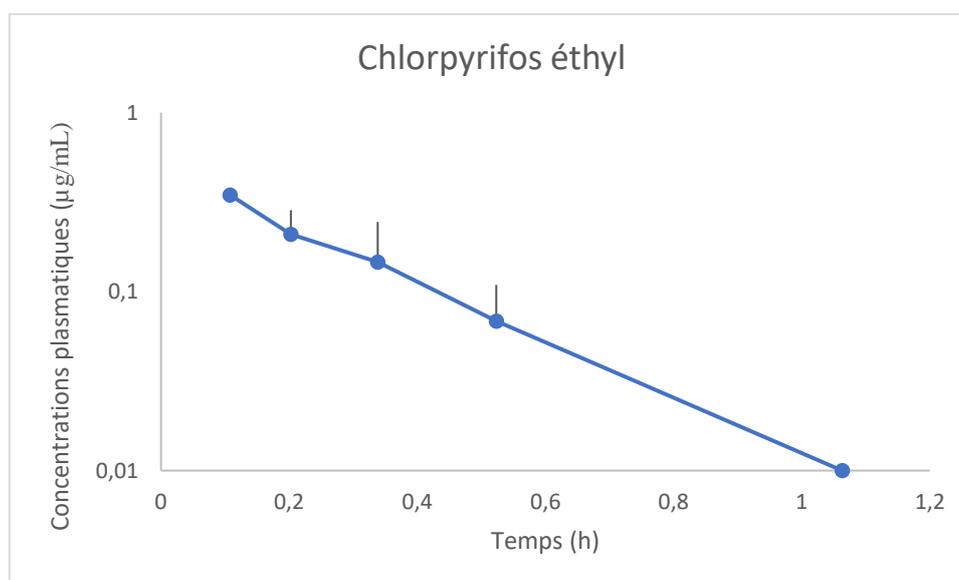


Figure 8 : Évolution temporelle des concentrations plasmatiques maternelles moyennes (\pm ET) de chlorpyrifos éthyl après une injection IV de 0.5 mg/kg de chlorpyrifos éthyl à 4 brebis gravides.

Après une administration fœtale, le chlorpyrifos n'a été dosé qu'une fois chez un fœtus à une concentration de 0.041 µg/mL, 5 minutes après l'injection. La concentration était inférieure à la LOD pour tous les autres temps de prélèvements et pour le liquide amniotique et le plasma maternel.

Paramètres toxicocinétiques du chlorpyrifos éthyl

Dans le compartiment maternel, le chlorpyrifos est rapidement éliminé avec une clairance plasmatique maternelle moyenne de 3351 ml/kg.h, représentant environ 70 % du débit cardiaque. Sa demi-vie d'élimination moyenne est de 0.27 h (Tableau 13). Le volume de distribution de 822 mL/kg en moyenne est élevé, ce qui est cohérent avec la lipophilicité très élevée du chlorpyrifos (LogP=4.7).

Après une administration fœtale, le chlorpyrifos n'a été détecté ni dans le compartiment fœtal, dans le liquide amniotique ou dans le compartiment maternel, excepté au temps 7 minutes sur un fœtus sur trois. Il n'a donc pas été possible de déterminer les paramètres toxicocinétiques du chlorpyrifos chez le fœtus. Toutefois, en prenant en compte une AUC min fœtale (Concentration plasmatique équivalente à la LOQ pendant 10 min), nous avons pu estimer une clairance fœtale du chlorpyrifos très élevée, supérieure à 38400 mL/kg.h.

| Paramètres toxicocinétiques | Mère | | | | | | Fœtus | |
|-----------------------------|----------|----------|----------|----------|---------|------------|---------|---------|
| | Brebis 1 | Brebis 2 | Brebis 3 | Brebis 4 | Moyenne | Écart-type | Fœtus 1 | Fœtus 2 |
| Cl (mL/(h*kg)) | 3169.86 | 2820.15 | 3279.81 | 4133.0 | 3350.71 | 557.15 | ND | ND |
| Vss (mL/kg) | 822.17 | 731.67 | 647.39 | 1087.6 | 822.23 | 190.82 | ND | ND |
| MRT (h) | 0.26 | 0.26 | 0.20 | 0.26 | 0.24 | 0.03 | ND | ND |
| t _{1/2} (h) | 0.15 | 0.19 | 0.19 | 0.56 | 0.27 | 0.19 | ND | ND |

Tableau 13 : Principaux paramètres toxicocinétiques du chlorpyrifos éthyl chez 4 brebis gravides après une administration IV de chlorpyrifos éthyl (0.5 mg/kg). Les paramètres toxicocinétiques du chlorpyrifos dans le compartiment fœtal n'ont pas pu être déterminés. ND : non déterminés.

En définitive, il semble que le fœtus soit peu exposé au chlorpyrifos via une exposition maternelle, en raison soit d'un passage materno-fœtal très faible, soit d'une clairance fœtale très élevée.

Transferts fœto-maternel et materno-fœtal du chlorpyrifos

Après une administration maternelle, le chlorpyrifos n'a pas été détecté dans le compartiment fœtal (plasma et liquide amniotique) excepté dans le plasma fœtal collecté 5 min après l'administration sur un fœtus sur 4, ce qui suggère soit que la clairance plasmatique fœtale du chlorpyrifos est élevée, soit que le passage placentaire materno-fœtal est faible.

La part de clairance placentaire fœto-maternelle n'a pas pu être évaluée. Elle a été estimée inférieure à 15 % (en prenant en compte une concentration maternelle maximale à la LOQ 10 min après l'administration fœtale). (Figure 9)

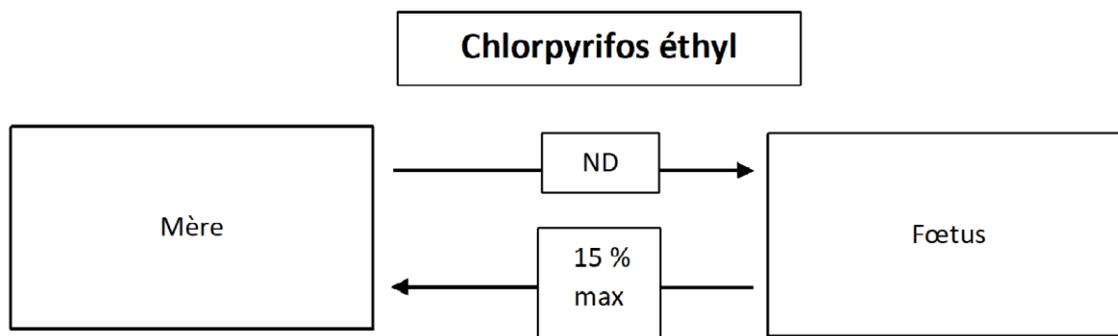


Figure 9 : Taux de transfert placentaire fœto-maternel maximum après une injection IV de chlorpyrifos éthyl (0.5mg/kg) à des brebis gravides et à leur fœtus cathétérisé. Les clairances placentaires n'ont pas pu être calculées. Le transfert fœto-maternel a été estimé inférieur à 15 %, en prenant en compte une concentration maternelle maximale à la LOQ 10 min après l'administration fœtale, sur 3 couples mère-fœtus.

D. Méthyl-thiophanate

La figure 10 présente l'évolution temporelle des concentrations plasmatiques moyennes (\pm ET) maternelles (courbe bleue) et fœtales (courbe orange) ainsi que des concentrations dans le liquide amniotique (courbe grise) du méthyl-thiophanate après une administration maternelle du mélange de six pesticides, à une dose de 4 mg/kg pour le méthyl-thiophanate.

Les concentrations plasmatiques maternelles de méthyl-thiophanate décroissent jusqu'à atteindre des valeurs proches de la LOD environ 72h après l'administration maternelle. Les concentrations plasmatiques fœtales décroissent lentement jusqu'au dernier prélèvement, 72h après l'injection. Dans le liquide amniotique, les concentrations de méthyl-thiophanate augmentent au cours des 10 premières heures puis décroissent jusqu'à 24h et sont ensuite inférieures à la LOD.

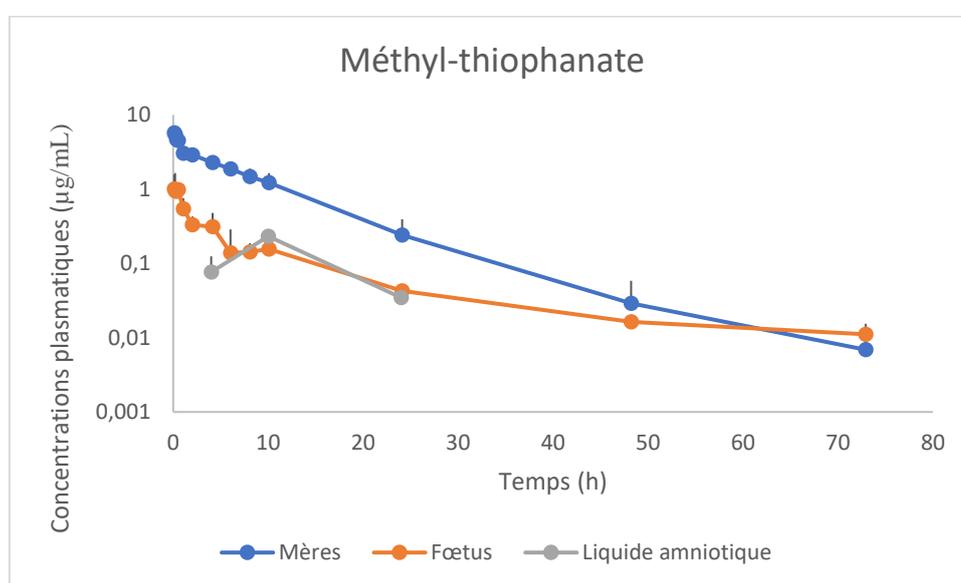


Figure 10 : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques maternelles (bleu) et fœtales (orange) et du liquide amniotique (gris) (moyennes \pm ET) de méthyl-thiophanate après une injection IV de 4 mg/kg de méthyl-thiophanate à 4 brebis gravides.

Le méthyl-thiophanate reste donc à des concentrations supérieures à la LOD au moins 72h après l'injection maternelle. Les concentrations fœtales décrivent un plateau de 24 à 72h après l'administration maternelle, qui pourrait être lié à une lente entrée du méthyl-thiophanate dans la circulation fœtale et qui pourrait provenir de la réactivation de métabolites.

Après une administration maternelle, l'exposition interne du fœtus est environ 5 à 32 fois inférieure à celle de sa mère (rapport d'AUC).

La figure 11 présente l'évolution temporelle des concentrations plasmatiques moyennes (\pm ET) des concentrations plasmatiques maternelles (courbe bleue) et fœtales (courbe orange) du méthyl-thiophanate après l'injection fœtale du mélange de six pesticides, à une dose de 4 mg/kg pour le méthyl-thiophanate.

Après l'administration fœtale, les concentrations plasmatiques maternelles de méthyl-thiophanate décroissent jusqu'à atteindre des valeurs inférieures à la LOD après environ 10h. Les concentrations plasmatiques fœtales décroissent lentement jusqu'à 8h après l'injection, puis un plateau se met en place jusqu'à 24h après l'injection, les concentrations passent alors sous les valeurs de LOD. Dans le liquide amniotique, le méthyl-thiophanate n'est pas détecté.

Après l'administration fœtale, le méthyl-thiophanate reste donc à des concentrations supérieures à la LOD durant 10h dans la circulation maternelle et 24h dans la circulation fœtale. La persistance des concentrations plasmatiques chez le fœtus pourrait être liée à une recirculation du méthyl-thiophanate dans l'unité materno-fœto-placentaire, ou à une réactivation de métabolites dans le compartiment fœtal.

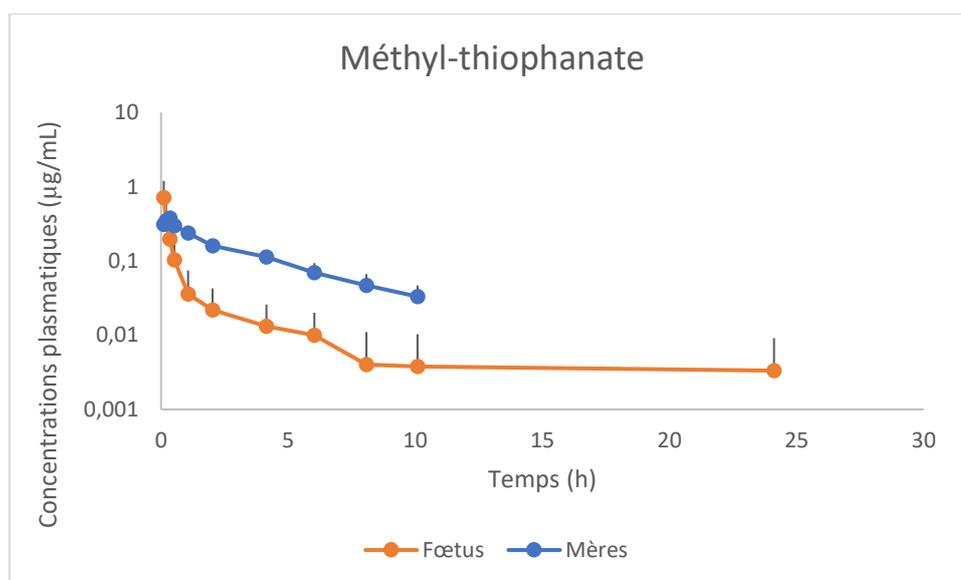


Figure 11 : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques maternelles (bleu) et fœtales (orange) et du liquide amniotique (gris) (moyennes \pm ET) de méthyl-thiophanate après une injection IV de 4 mg/kg de méthyl-thiophanate à 3 fœtus cathétérisés.

Paramètres toxicocinétiques

Dans le compartiment maternel, le méthyl-thiophanate est lentement éliminé avec une clairance plasmatique maternelle moyenne de 125 ml/kg.h, représentant seulement 3 % du débit cardiaque. Sa demi-vie d'élimination est de 7.8 h. Le volume de distribution, de 1053 mL/kg en moyenne, est élevé (Tableau 17).

Dans le compartiment fœtal, le méthyl-thiophanate est très rapidement éliminé avec une clairance plasmatique de 8050 et 21046 mL/kg.h et une demi-vie d'élimination plasmatique de 0.25 et 0.12 h, évaluées sur deux fœtus (Tableau 14).

| Paramètres toxicocinétiques | Mère | | | | | | Fœtus | |
|-----------------------------|----------|----------|----------|----------|---------|------------|---------|----------|
| | Brebis 1 | Brebis 2 | Brebis 3 | Brebis 4 | Moyenne | Écart-type | Fœtus 1 | Fœtus 2 |
| Cl (mL/(h*kg)) | 89.61 | 167.12 | 104.32 | 140.86 | 125.48 | 35.14 | 8050.35 | 21046.31 |
| Vss (mL/kg) | 1047.05 | 1178.96 | 973.98 | 1011.17 | 1052.79 | 89.25 | 3751.08 | 1712.91 |
| MRT (h) | 11.68 | 7.05 | 9.34 | 7.18 | 8.81 | 2.18 | 0.26 | 0.07 |
| t _{1/2} (h) | 10.89 | 5.95 | 8.83 | 5.60 | 7.82 | 2.51 | 0.25 | 0.13 |

Tableau 14 : Principaux paramètres toxicocinétiques du méthyl-thiophanate chez 4 brebis gravides et 2 de leur fœtus cathétérisés après une administration unique en IV de méthyl-thiophanate (4 mg/kg).

Transferts fœto-maternel et materno-fœtal

56 % de la dose maternelle de méthyl-thiophanate est transféré au fœtus, ce qui signifie que le fœtus reçoit une dose rapportée à son poids environ 14 fois supérieure à celle de sa mère. La totalité de la dose fœtale est éliminée par passage placentaire (109 %, 125 % et 141 % pour les trois fœtus, Figure 12).

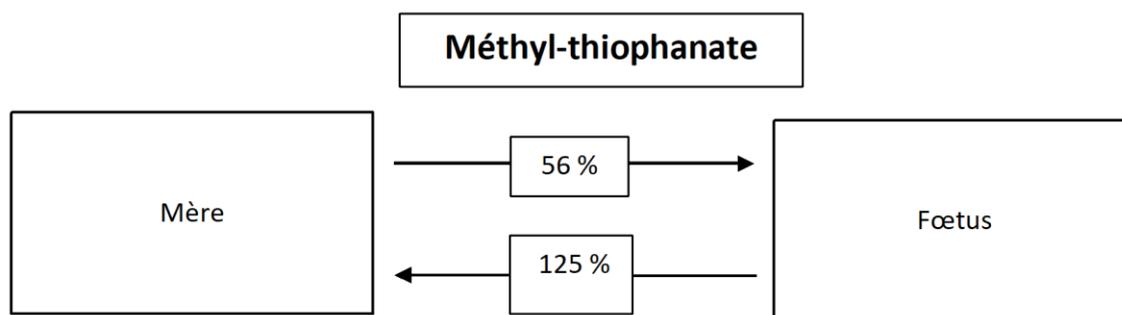


Figure 12 : Taux de transfert materno-fœtal (n=5) et fœto-maternel (n=3) moyens après une injection IV de méthyl-thiophanate (4 mg/kg) à des brebis gravides et à des fœtus cathétérisés.

E. Thiaclopride

La figure 13 présente l'évolution temporelle des concentrations plasmatiques moyennes (\pm ET) maternelles (courbe bleue) et fœtale (courbe orange) ainsi que des concentrations dans le liquide amniotique (courbe grise) du thiaclopride après l'administration maternelle du mélange de six pesticides, à une dose de 0.5 mg/kg pour le thiaclopride.

Après l'administration maternelle, les concentrations plasmatiques maternelles de thiaclopride décroissent jusqu'à atteindre une valeur de 0.01 μ g/mL après environ 72h. Les concentrations plasmatiques fœtales décroissent jusqu'à 48h après l'administration et sont ensuite inférieures à la LOD. Dans le liquide amniotique, la concentration de thiaclopride diminue lors des 24 premières heures puis augmente jusqu'à 48h et décroît de nouveau jusqu'au dernier prélèvement, 72h post injection.

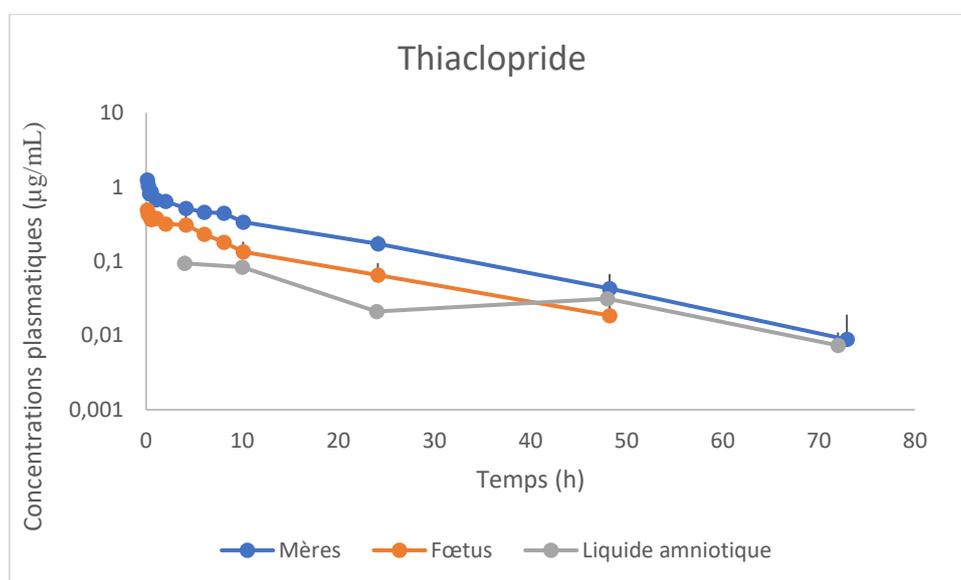


Figure 13 : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques maternelles (bleu) et fœtales (orange) et du liquide amniotique (gris) (moyennes \pm ET) de thiaclopride après une injection IV de 0.5 mg/kg de thiaclopride à 4 brebis gravides.

Le thiaclopride est donc lentement éliminé de la circulation maternelle, il est encore détectable, à la fois dans le compartiment maternel et fœtal 72h après l'administration. Les concentrations dans le plasma fœtal sont seulement 1.6 à 2.6 fois inférieures aux concentrations maternelles, ce qui signifie que le transfert placentaire materno-fœtal est important.

Après une administration maternelle, l'exposition interne fœtale au thiaclopride est 1.9 à 2.1 fois inférieure à celle de sa mère (rapport d'AUC).

La figure 14 présente l'évolution temporelle des concentrations plasmatiques moyennes (\pm ET) maternelles (courbe bleue) et fœtales (courbe orange) ainsi que des concentrations dans le liquide amniotique (courbe grise) du thiaclopride après l'injection fœtale du mélange de six pesticides, à une dose de 0.5 mg/kg pour le thiaclopride.

Après l'administration fœtale, les concentrations plasmatiques maternelles de thiaclopride décroissent jusqu'à atteindre une valeur de 0.001 μ g/mL, correspondant à la LOD, après environ 72h, les concentrations sont ensuite inférieures à la LOD jusqu'au dernier prélèvement, 168h après l'injection fœtale. Les concentrations plasmatiques fœtales décroissent jusqu'à 10h après l'injection, les concentrations sont ensuite inférieures à la LOD. Dans le liquide amniotique, les concentrations de thiaclopride diminuent lors des 24 premières heures puis deviennent ensuite inférieures à la LOD.

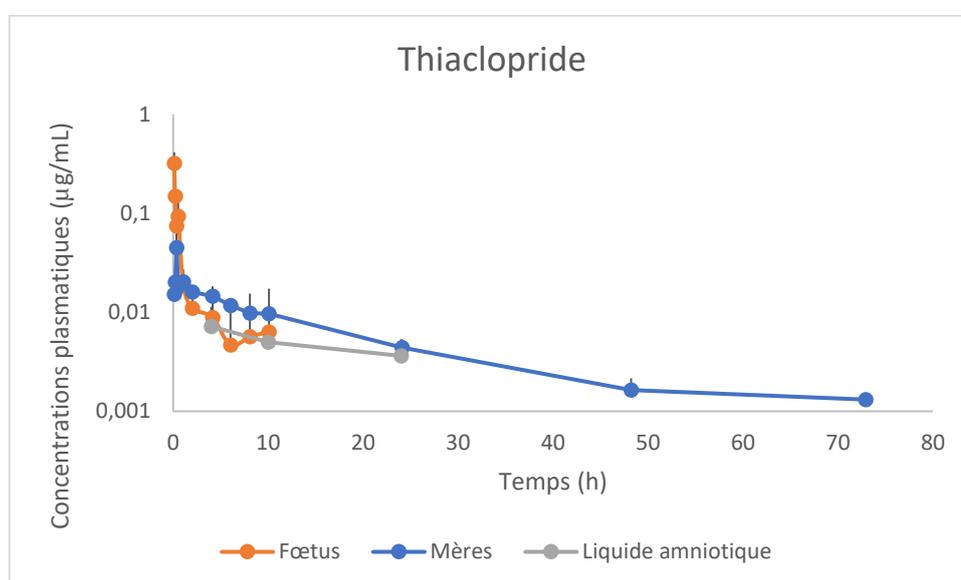


Figure 14 : Évolution temporelle des concentrations plasmatiques maternelles (bleu) et fœtales (orange) et du liquide amniotique (gris) (moyennes \pm ET) de thiaclopride après une injection IV de 0.5 mg/kg de thiaclopride à 3 fœtus cathétérisés.

Paramètres toxicocinétiques

Dans le compartiment maternel, le thiaclopride est lentement éliminé avec une clairance plasmatique maternelle de 42.7 ml/kg.h, représentant environ 1 % du débit cardiaque. Sa demi-vie d'élimination est de 9.6 h. Le volume de distribution de 620 mL/kg en moyenne est élevé. (Tableau 19). Dans le compartiment fœtal, le thiaclopride est rapidement éliminé avec une clairance plasmatique de 1035 et 1717 mL/kg.h et une demi-vie d'élimination plasmatique évaluée sur deux fœtus de 0.28 et 0.4 h (Tableau 15).

| Paramètres toxicocinétiques | Mère | | | | | | Fœtus | |
|-----------------------------|----------|----------|----------|----------|---------|------------|---------|---------|
| | Brebis 1 | Brebis 2 | Brebis 3 | Brebis 4 | Moyenne | Écart-type | Fœtus 1 | Fœtus 2 |
| Cl (mL/(h*kg)) | 36.79 | 41.85 | 35.43 | 56.62 | 42.67 | 9.70 | 1035.76 | 1717.93 |
| Vss (mL/kg) | 674.57 | 630.08 | 577.08 | 598.34 | 620.02 | 42.39 | 774.19 | 1548.08 |
| MRT (h) | 18.34 | 15.05 | 16.29 | 10.57 | 15.06 | 3.29 | 0.21 | 0.42 |
| t _{1/2} (h) | 11.63 | 8.09 | 11.10 | 7.59 | 9.61 | 2.06 | 0.28 | 0.40 |

Tableau 15 : Principaux paramètres toxicocinétiques du thiaclopride chez 4 brebis gravides et 2 de leur fœtus cathétérisés après une administration IV de thiaclopride (0.5 mg/kg)

Transferts fœto-maternel et materno-fœtal

69 % de la dose maternelle de thiaclopride est transféré au fœtus, ce qui signifie que le fœtus reçoit une dose rapportée à son poids environ 20 fois supérieure à celle de sa mère. 70 % de la dose fœtale est éliminée par passage placentaire. Après la première phase d'élimination très rapide, un plateau de concentrations de thiaclopride dans le plasma fœtal et le liquide amniotique d'environ 0.08 µg/ml est observée dans les 24h après l'administration. (Figure 15)

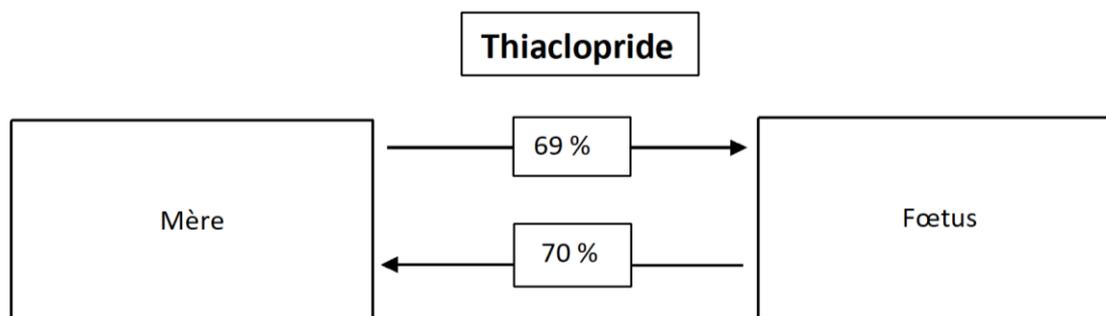


Figure 15 : Taux de transfert materno-fœtal (n=5) et fœto-maternel (n=3) moyens après une injection IV de thiaclopride (0.5 mg/kg) à des brebis gravides et à leur fœtus cathétérisés.

En définitive, le thiaclopride est lentement éliminé de la circulation maternelle. Le transfert placentaire materno-fœtal est important. Dans le compartiment fœtal, le thiaclopride décrit une première phase d'élimination rapide, notamment par transfert placentaire fœto-maternel puis une deuxième phase plus lente qui pourrait être liée à la recirculation du thiaclopride dans l'unité materno-fœto-placentaire.

F. Zirame

La figure 16 présente l'évolution temporelle (moyenne \pm ET) des concentrations plasmatiques maternelles (courbe bleue) du zirame après l'administration maternelle du mélange de six pesticides, à une dose de 0.3 mg/kg pour le zirame. Les concentrations plasmatiques maternelles de zirame décroissent jusqu'à atteindre des valeurs inférieures à la LOD environ 2h après l'administration. Il n'est détecté ni chez le fœtus ni dans le liquide amniotique.

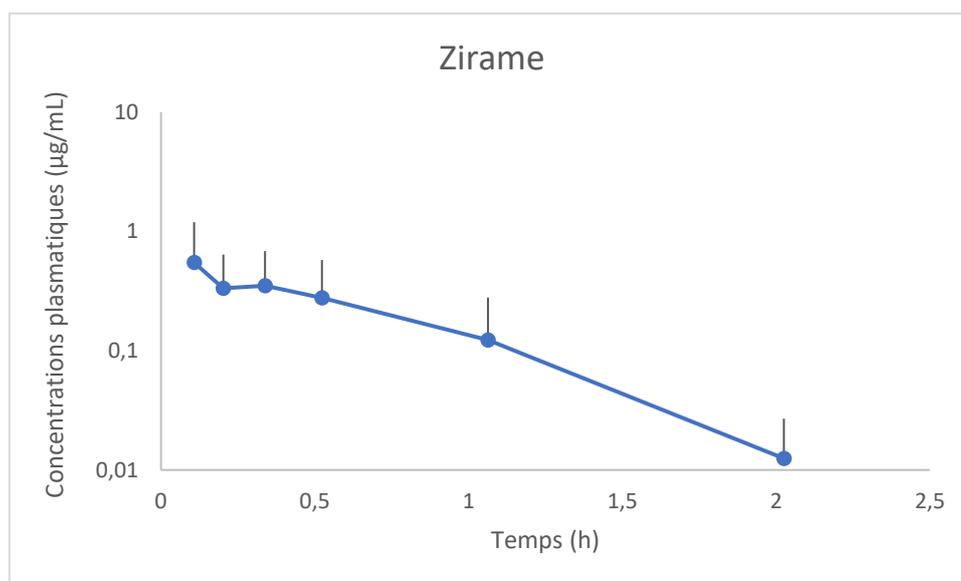


Figure 16 : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques maternelles (bleu) (moyennes \pm ET) de zirame après une injection IV de 0.3 mg/kg de zirame à 3 brebis gravides.

Le zirame est donc éliminé rapidement de la circulation maternelle et n'est pas détecté dans le compartiment fœtal, soit parce que la clairance fœtale est très élevée, soit parce que le zirame ne passe pas la barrière placentaire.

Après l'administration fœtale, le zirame n'a jamais été détecté dans la circulation fœtale, maternelle ou le liquide amniotique, excepté au temps 8 min sur un fœtus sur 3. La dose totale injectée au fœtus était de 0.9 mg (0.5mg/kg).

Paramètres toxicocinétiques

Dans le compartiment maternel, le zirame est éliminé avec une clairance plasmatique maternelle moyenne de 644 ml/(kg.h), représentant environ 14 % du débit cardiaque. Sa demi-vie d'élimination est de 0.41 h. Le volume de distribution de 504 mL/kg en moyenne est élevé (Tableau 16).

Il n'a pas été possible de déterminer les paramètres toxicocinétiques fœtaux du zirame. Toutefois, en prenant en compte une AUC min fœtale (Concentration plasmatique équivalente à la LOQ pendant 10 min), nous avons pu estimer une clairance fœtale du zirame très élevée, supérieure à 115800 mL/(kg.h).

| Paramètres toxicocinétiques | Mère | | | | | | Fœtus | |
|-----------------------------|----------|----------|----------|----------|---------|------------|---------|---------|
| | Brebis 1 | Brebis 2 | Brebis 3 | Brebis 4 | Moyenne | Écart-type | Fœtus 1 | Fœtus 2 |
| Cl (mL/(h*kg)) | 392.69 | 380.57 | 1160.55 | ND | 644.60 | 446.86 | ND | ND |
| V _{ss} (mL/kg) | 247.45 | 61.03 | 1202.75 | ND | 503.74 | 612.49 | ND | ND |
| MRT (h) | 0.63 | 0.16 | 1.04 | ND | 0.61 | 0.44 | ND | ND |
| t _{1/2} (h) | 0.31 | 0.16 | 0.75 | ND | 0.41 | 0.31 | ND | ND |

Tableau 16 : Principaux paramètres toxicocinétiques du zirame chez 3 brebis gravides après une administration unique en IV de zirame (0.3 mg/kg)

Transferts fœto-maternel et materno-fœtal du zirame

Après une administration maternelle, le zirame n'a pas été détecté dans le compartiment fœtal (plasma ou liquide amniotique), ce qui suggère soit que la clairance plasmatique fœtale du zirame est élevée, soit que le passage placentaire materno-fœtal est très faible. La part de clairance placentaire fœto-maternelle n'a pas pu être évaluée. Elle a été estimée inférieure à 14 % (en prenant en compte une concentration maternelle maximale à la LOQ 10 min après l'administration fœtale) (Figure 17).

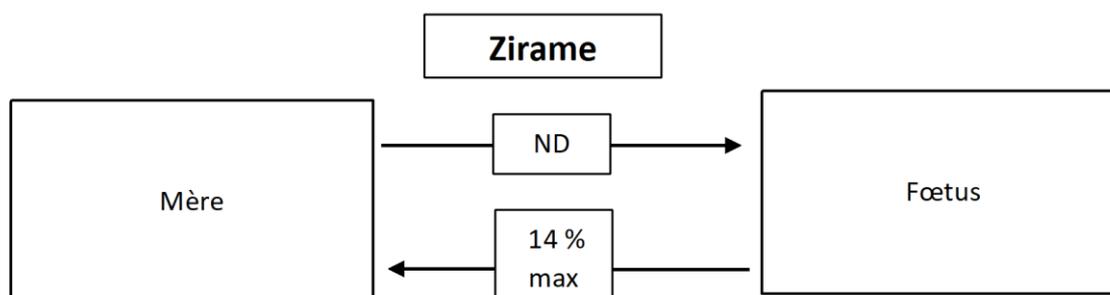


Figure 17 : Taux de transfert fœto-maternel maximal après une injection IV de Zirame (0.3 mg/kg) à des brebis gravides et leur fœtus cathétérisé. Les clairances placentaires n'ont pas pu être calculées. Le transfert fœto-maternel a été estimé inférieur à 15 %, en prenant en compte une concentration maternelle maximale à la LOQ 10 min après l'administration fœtale, sur 3 couples mère-fœtus.

En définitive, il semble que le fœtus soit peu exposé au zirame via une exposition maternelle, en raison d'une clairance fœtale très élevée associée éventuellement à un passage materno-fœtal très faible.

IV. Discussion générale

La disposition des pesticides dans l'unité materno-fœto-placentaire a été caractérisée.

- Le zirame et le chlorpyrifos sont éliminés très rapidement du compartiment fœtal, avec des demi-vies inférieures à 1h et semblent être faiblement transférés au compartiment fœtal. Le fœtus est donc très peu exposé au zirame ou au chlorpyrifos après une exposition maternelle ;
- Le boscalide, le méthyl-thiophanate, le thiaclopride et le THPI (métabolite du captane) sont éliminés plus lentement, avec des demi-vies entre 1.5 et 9.5h. Le transfert materno-fœtal varie de 7 à 69% de la dose maternelle en fonction des pesticides. Compte tenu du rapport pondéral entre la mère et son fœtus, de 25 environ, cela signifie que le fœtus reçoit une dose rapportée à son poids, de 2 à 17 fois celle de sa mère pour ces 4 pesticides.

Le tableau 17 synthétise les paramètres toxicocinétiques maternels des 6 pesticides et leur interprétation par rapport à des constantes physiologiques. La clairance plasmatique maternelle est élevée pour le chlorpyrifos et modérée pour le boscalide et le zirame. Le THPI, le méthylthiophanate et le thiaclopride ont une clairance faible et persistent plus longtemps dans l'organisme ($t_{1/2}$ de 6 à 10h). Le volume de distribution à l'équilibre de tous ces pesticides est très important (50 à 100 % du poids corporel), ce qui signifie que ces molécules diffusent bien dans les tissus, à la fois dans les liquides extracellulaires et intracellulaires.

| | Clairance (mL/(h*kg)) | % du débit cardiaque | Interprétation (d'après Toutain et al., 2004) | $t_{1/2}$ élimination (h) | Données bibliographiques (élimination chez le rat, Agritox) | Vss (ml/kg) | Vss/ Volume plasmatique |
|------------------------------------|--------------------------|----------------------------|--|---------------------------------|---|----------------|-------------------------------|
| Boscalide | 813.62 | 20% | Moyen | 1.58 | ND | 888 | 22.2 |
| THPI (métabolite du captane) | 36.66 | 1% | Faible | 5.63 | Rapide | 377.3 | 9.4 |
| Chlorpyrifos éthyl | 3350.71 | 70% | Élevée | 0.27 | 48h | 822.2 | 20.6 |
| Méthyl- thiophanate | 125.48 | 3% | Faible | 7.82 | 96h | 1052.8 | 26.3 |
| Thiaclopride | 42.67 | 1% | Faible | 9.61 | 24h | 620 | 15.5 |
| Zirame | 644.60 | 14% | Faible | 0.41 | > 168h | 503.8 | 12.6 |

Tableau 17 : Clairances plasmatiques maternelles, demi-vies d'élimination plasmatiques maternelles et volumes de distribution à l'équilibre maternels (moyenne) des six pesticides évalués chez 4 brebis gravides et interprétation par rapport aux constantes physiologiques : débit cardiaque de la brebis : 86 mL/(kg.min) et volume plasmatique : 40 mL/kg, (d'après Toutain et al., 2004).

Les données toxicocinétiques pour ces pesticides sont peu documentées dans les études publiées.

Les paramètres toxicocinétiques du boscalide ont été déterminés chez le rat après une administration IV à la dose de 1 mg/kg, le volume de distribution était très élevé de 46.2L/kg (Wambaugh, 2018), 50 fois plus important que chez la brebis, ce qui est cohérent avec la lipophilicité relativement élevée du boscalide (LogP=2.96) (Agritox, *Boscalid*, 2006). L'élimination du boscalide est rapide (Agritox, *Boscalid*, 2006), ce qui est en accord avec le temps de demi-vie d'élimination plasmatique d'1h30 environ, évaluée chez la brebis.

Pour le captane, les paramètres toxicocinétiques ont été évalués en considérant que tout le captane est totalement et rapidement métabolisé en THPI (Gordon et al., 2001). Toutefois, le captane peut être métabolisé en d'autres métabolites, notamment des métabolites hydroxylés comme cela a été montré chez le rat (Lappin et Havell, 1990). Ces métabolites ne sont pas mesurés par la méthode de dosage.

Les paramètres toxicocinétiques du métabolite du captane (THPI) ont été déterminés chez l'homme (Berthet et al., 2012) après une administration orale de captane à la dose de 1 mg/kg. En accord avec nos résultats, le temps de demi-vie d'élimination plasmatique était relativement rapide, de 13.43 h, contre 5.6 h pour la brebis. La clairance plasmatique apparente est de 0.18 L/h (de l'ordre de 3 mL/kg.h). La fraction de THPI qui atteint la circulation systémique a été estimée à 8.58% (Heredia-Ortiz, 2012), ce qui signifie que la clairance plasmatique chez l'homme pourrait être du même ordre de grandeur que celle évaluée chez la brebis, après une administration IV (37 mL/kg.h). Le volume de distribution (Vd) chez l'homme est faible, de 3.5 L, et correspond au volume plasmatique.

Pour le chlorpyrifos éthyl, une étude toxicocinétique a été réalisée chez le rat après une administration par voie orale de chlorpyrifos éthyl à la dose de 10 et 60 mg/kg (Timchalk et al., 2005). Le chlorpyrifos est totalement absorbé et extensivement métabolisé, avec une clairance apparente du chlorpyrifos de 2 à 3 L/h, soit 6 à 9 L/h.kg. Ainsi, si on considère une absorption et une biodisponibilité par voie orale élevées, cette clairance est proche de la clairance plasmatique évaluée chez la brebis, qui était en moyenne de 3.4 L/kg.h. Le volume de distribution du chlorpyrifos chez la brebis est très élevée, de 822 mL/kg en moyenne, ce qui est cohérent avec sa lipophilicité très élevée (LogP=4.7) (Agritox, *Chlorpyrifos éthyl*, 2015).

Une co-exposition des rats au chlorpyrifos et au diazinon n'a pas influencé la TK du chlorpyrifos (Timchalk et al., 2005), tandis qu'une co-exposition à la cyperméthrine et au chlorpyrifos a entraîné une diminution de l'exposition interne au chlorpyrifos (Wielgomas, 2006). Par conséquent, dans notre étude pour laquelle six pesticides ont été administrés en mélange, les paramètres TK évalués pourraient être différents de ceux observés pour chaque pesticide administré isolément. Toutefois, ce mode d'exposition en mélange reflète davantage l'exposition environnementale.

Pour le méthyl-thiophanate, le thiaclopride, le zirame, aucune étude TK n'est publiée. Les études toxicologiques réalisés sur le rat, après une administration orale, indiquent une élimination du méthylthiophanate de 70% dans les 96h après une administration par voie orale. Pour le thiaclopride, l'élimination est rapide, de 53-66% en moins de 24h. Pour le zirame, l'élimination est plus lente, 64 à 85% de la dose absorbée est éliminée en 168h et le temps de demi-vie est supérieur à 24h, ce qui n'est pas cohérent avec nos résultats obtenus sur le modèle de brebis gravide (temps de demi-vie d'élimination de 25 minutes environ).

Le tableau 18 synthétise les paramètres toxicocinétiques des fœtus pour ces 6 pesticides et leur interprétation par rapport à des constantes physiologiques. La clairance plasmatique fœtale est élevée pour le méthyl-thiophanate et modérée pour le boscalide. Le THPI et le thiaclopride ont une clairance faible. Les volumes de distribution sont très élevés pour le boscalide, le méthyl-thiophanate et le thiaclopride, ces deux dernières molécules se distribuent dans le liquide amniotique.

| | Clairance (mL/(h*kg)) | % du débit cardiaque | Interprétation (d'après Toutain et al., 2004) | t _{1/2} élimination (h) | Données bibliographiques (élimination chez le rat) | V _{ss} (ml/kg) | V _{ss} / Volume plasmatique |
|------------------------------------|--------------------------|----------------------------|--|--|---|----------------------------|--|
| Boscalide | 5327.9 | 22% | Moyen | 0.45 | ND | 3128.9 | 78.2 |
| THPI (métabolite du captane) | 173 | 1% | Faible | ND | Rapide | ND | ND |
| Chlorpyrifos éthyl | ND | ND | ND | ND | 48h | ND | ND |
| Méthyl- thiophanate | 14548.3 | 61% | Élevé | 0.29 | 96h | 2732 | 68.3 |
| Thiaclopride | 1376.9 | 6% | Faible | 0.34 | 24h | 1161.1 | 29 |
| Zirame | ND | ND | ND | ND | > 168h | ND | ND |

Tableau 18 : Bilan des clairances plasmatiques fœtales, des demi-vies d'élimination fœtales et des volumes de distribution à l'équilibre des six pesticides étudiés chez les fœtus ovins et interprétation par rapport aux constantes physiologiques (débit cardiaque fœtal de 400 mL/(kg.min) d'après Gauderat, 2016 et volume plasmatique : 40 mL/kg d'après Toutain et al., 2004).

Même si notre étude nous a permis d'évaluer les principaux mécanismes déterminant l'exposition fœtale, elle présente certaines limites liées notamment aux limites de quantification relativement élevées de certains pesticides (THPI : 0.5 µg/mL, zirame : 0.025 µg/mL, et méthyl-thiophanate, boscalide et chlorpyrifos éthyl : 0.01 µg/mL), qui ne nous ont pas permis de suivre les molécules suffisamment longtemps après l'administration pour caractériser avec précision leurs paramètres toxicocinétiques, et notamment la demi-vie d'élimination. C'est notamment le cas pour le zirame et le chlorpyrifos pour lesquels les doses administrées étaient relativement faibles (0.3 et 0.5 mg/kg, respectivement). De plus, le très large volume de distribution de ces pesticides, notamment dans le compartiment fœtal, explique également la difficulté de suivre la décroissance des concentrations de pesticides dans les compartiments fœtal et maternel. Ainsi, de manière surprenante, le chlorpyrifos et le zirame n'ont pas été détectés dans la circulation fœtale après une administration fœtale.

Ces limites expliquent certainement en partie la variabilité des paramètres toxicocinétiques entre les couples mère-fœtus. Une autre source de variabilité est le poids fœtal et le nombre de fœtus (Tableau 8). Ces facteurs peuvent notamment influencer le transfert materno-fœtal.

Des analyses toxicocinétiques complémentaires seront réalisées globalement sur l'ensemble des individus et non pas individu par individu pour prendre en compte les données éparses, notamment pour le chlorpyrifos et le zirame qui ont été suivis quelques heures seulement.

Conclusion

Cette étude avait pour objectif d'évaluer les paramètres TK des 6 pesticides sur le modèle de la brebis gravide et de déterminer les mécanismes déterminant l'exposition fœtale aux pesticides. Nous avons montré que 4 des 6 pesticides (boscalide, thiaclopride, méthyl-thiophanate, métabolite du captane), passaient de la mère au fœtus et que le fœtus recevait via sa mère, une dose 2 à 20 fois supérieure à la dose interne maternelle. Toutefois, l'exposition interne fœtale est, en fonction des pesticides, 1.1 à 32 fois inférieure à celle de sa mère, en raison notamment d'une clairance fœtale élevée (Tableau 19).

| | Boscalide | THPI | Chlorpyrifos éthyl | Méthyl- thiophanate | Thiaclopride | Zirame |
|--|-----------|-----------|-----------------------|------------------------|--------------|--------|
| Rapport des AUC plasmatiques maternelles sur celles des fœtus | 3.1 à 6.6 | 1.1 à 6.1 | ND | 5 à 32 | 1.9 à 2.1 | ND |
| Rapport de la dose reçue par le fœtus sur la dose reçue par la mère | 2 | 12 | ND | 16 | 20 | ND |
| Dose (en % DJA) à laquelle la population générale ou infantile est exposée par l'alimentation (d'après EAT2 et EATi) | 0.275 % | 1.4 % | 11 % (0-36 mois) | 1 % | 0.7 % | 1.8 % |
| Dose transférée au fœtus (en % de la DJA) pour une exposition alimentaire maternelle (d'après EAT2 et EATi) | 0.55 % | 17 % | / | 16 % | 14% | / |

Tableau 19 : Comparaison des expositions internes et externe fœtale (dose reçue par le fœtus via sa mère), à celles de sa mère. Extrapolation à une exposition fœtale maximale (en % de la DJA) pour une exposition alimentaire humaine (d'après EAT2 et EATi) et en considérant une biodisponibilité et une absorption élevées.

L'évaluation du risque lié à l'exposition fœtale à ces pesticides dépend à la fois de la DJA et des niveaux d'exposition, notamment via l'alimentation. Ainsi, les niveaux d'exposition de la population générale ou infantile évalués dans le cadre de l'EAT2 ou de l'EATi pour ces 4 pesticides sont de l'ordre de 0.3 à 1.8 % de la DJA. Ainsi, même si le fœtus reçoit une dose rapportée à son poids 20 fois supérieure à celle de sa mère, la dose reçue reste relativement élevée, même si elle est inférieure à la DJA (de 14 à 17 %, excepté pour le boscalide, 0.55 %). En outre, pour certains pesticides comme le méthyl-thiophanate ou le thiaclopride, plus persistants dans le compartiment maternel, il serait essentiel d'évaluer si ces molécules peuvent s'accumuler dans le compartiment fœtal.

Par ailleurs, pour extrapoler l'exposition fœtale du modèle de brebis gravide à l'homme et compte tenu des différences interspécifiques de placentation, il est nécessaire d'évaluer le passage placentaire des pesticides sur le modèle de placenta humain perfusé.

Bibliographie

Avis et rapport relatif à l'Étude de l'alimentation totale française 2 (EAT2) : Tome 2 : Résidus de pesticides, additifs, acrylamide, hydrocarbures aromatiques polycycliques, Anses, 2011. Consulté sur : <https://www.anses.fr/fr/system/files/PASER2006sa0361Ra2.pdf>

Berthet A., Bouchard M., (2012). Toxicokinetics of captan and folpet biomarkers in orally exposed volunteers. *Journal of Applied Toxicology*, 32 Issue 3, 194-201.

Boscalid (formerly Nicobifen), dernière mise à jour le 24/09/2019. Consulté sur : <https://echa.europa.eu/fr/substance-information/-/substanceinfo/100.115.343>

Boscalid, dernière mise à jour le 11/06/2019. Consulté sur : <https://ephy.anses.fr/substance/boscalid>

Boscalid, AGRITOX – Base de données sur les substances actives phytopharmaceutiques, dernière mise à jour le 26/01/2006.

Captan, dernière mise à jour le 04/07/2019. Consulté sur : <https://echa.europa.eu/fr/substance-information/-/substanceinfo/100.004.626>

Captan, dernière mise à jour le 11/06/2019. Consulté sur : <https://ephy.anses.fr/substance/captan>

Captane, AGRITOX – Base de données sur les substances actives phytopharmaceutiques, dernière mise à jour le 12/01/2009.

Casado J., Bridgen., Santillo D., Johnston P., (2019), Screening of pesticides and veterinary drugs in small streams in the European Union by liquid chromatography high resolution mass spectrometry, *Science of The Total Environment*, 670, 1204-1225.

Chlorpyrifos, dernière mise à jour le 10/07/2019. Consulté sur : <https://echa.europa.eu/fr/substance-information/-/substanceinfo/100.018.969>

Chlorpyrifos, dernière mise à jour le 19/03/2019. Consulté sur : <https://ephy.anses.fr/substance/chlorpyrifos>

Chlorpyrifos-ethyl, AGRITOX – Base de données sur les substances actives phytopharmaceutiques, dernière mise à jour le 14/09/2015.

DIRECTIVE 2006/125/CE DE LA COMMISSION du 5 décembre 2006 concernant les préparations à base de céréales et les aliments pour bébés destinés aux nourrissons et aux enfants en bas âge, Journal officiel de l'Union européenne (2006).

EFSA. 2009. Refined risk assessment regarding certain MRLs of concern for the active substances carbendazim and thiophanate-methyl, reasoned opinion of EFSA prepared by the pesticides unit (PRAPeR). In *EFSA Scientific Report*. Parma : EFSA

EFSA. 2011. The 2009 European Union report on pesticide residues in food. In *The EFSA journal*. Parma : EFSA.

EFSA. 2013. The 2010 European Union Report on Pesticide Residues in Food. In *The EFSA journal*. Parma : EFSA.

Federoff N. E., Melendez J., Khan F., (2001), *Environmental Fate and Ecological Risk Assessment for the Reregistration of Ziram*, United States Environmental Protection Agency et Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances. 30/10/2011

Gauderat G., Picard-Hagen N., Toutain P. L., Corbel T., Viguié C., Puel S., Lacroix M. Z., Mindeguia P., Bousquet-Melou A., Gayraud V., (2016), Bisphenol A glucuronide deconjugation is a determining factor of fetal exposure to bisphenol A, *Environment International*, 86, 52-59.

Gauderat G., 2016. Impact des processus métaboliques fœto-placentaires sur l'exposition fœtale au bisphénol A. Doctorat de l'Université de Toulouse, Toxicologie et chaîne alimentaire. INSA de Toulouse. Français. NNT : 2016ISAT0013.

Gordon, E.B., Ehrlich, T., Mobley, S., Williams, M., (2001). Measurement of the reaction between the fungicides captan or folpet and blood thiols. *Toxicol Methods*, 11, 209-223.

Harding R., Bocking A.D., Siggerand J.N., Wickham P.J.D., (1984), Composition and volume of fluid swallowed by fetal sheep, *Quarterly Journal of Experimental Physiology*, 69, 487-495.

Heredia-Ortiz R., Bouchard M., (2012). Toxicokinetic modeling of captan fungicide and its tetrahydrophthalimide biomarker of exposure in humans, *Toxicology Letters*, Volume 213, Issue 1, Pages 27-34, ISSN 0378-4274, <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.09.023>.

Lappin, G.J., Havell, M.L., (1990). Captan: biotransformation study in the rat. Report No. CTL/P/2951. ICI Central Toxicology Laboratory, Alderley Park, Macclesfield, Cheshire, United Kingdom. Unpublished report

Rapport de l'Anses - EAT infantile Tome 2 - Partie 4 - Résultats relatifs aux résidus de pesticides, Anses, 2016. Consulté sur :

<https://www.anses.fr/fr/system/files/ERCA2010SA0317Ra-Tome2-Part4.pdf>

Rat de laboratoire, Wikipédia. Consulter sur :

https://fr.wikipedia.org/wiki/Rat_de_laboratoire

Thiacloprid, dernière mise à jour le 18/02/2019. Consulté sur :

<https://ephy.anses.fr/substance/thiacloprid>

Thiacloprid, AGRITOX – Base de données sur les substances actives phytopharmaceutiques, dernière mise à jour le 26/04/2018.

Thiophanate-methyl, dernière mise à jour le 03/07/2019. Consulté sur :

<https://echa.europa.eu/fr/substance-information/-/substanceinfo/100.041.567>

Thiophanate-methyl, dernière mise à jour le 15/10/2019. Consulté sur :

<https://ephy.anses.fr/substance/thiophanate-methyl>

Thiophanate-methyl, AGRITOX – Base de données sur les substances actives phytopharmaceutiques, dernière mise à jour le 08/06/2005.

Timchalk C, Poet TS, Hinman MN, Busby AL, Kousba AA. Pharmacokinetic and pharmacodynamic interaction for a binary mixture of chlorpyrifos and diazinon in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005 May 15 ; 205(1) : 31-42.

Toutain P. L., Bousquet-Mélou A., (2004) Plasma clearance. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics.* 27, 415-425.

Toutain P. L., Bousquet-Mélou A., (2004) Volumes of distribution. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics.* 27, 441-453.

Wambaugh J. F., Hughes M. F., Ring C. L., MacMillan D. K., Ford J., Fennell T. R., Black S. R., Snyder R. W., Sipes N. S., Wetmore B. A., Westerhout J., Woodrow Setzer R., Pearce R. G., Simmons J. E., Thomas R. S. (2018). Evaluating *In Vitro – In Vivo* Extrapolation of Toxicokinetics. *Toxicol. Sci.* 163, Issue 1, May 2018, 152–169.

Wielgomas B., Krechniak J., Toxicokinetic Interactions of α -Cypermethrin and Chlorpyrifos in Rats, *Polish J. of Environ. Stud.* Vol. 16, No. 2 (2007), 267-274.

(Z)-3-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-1,3-thiazolidin-2-ylidenecyanamide; thiachloprid (ISO); {(2Z)-3-[(6-chloropyridin-3-yl)methyl]-1,3-thiazolidin-2-ylidene}cyanamide, dernière mise à jour le 24/09/2019. Consulté sur : <https://echa.europa.eu/fr/substance-information/-/substanceinfo/100.129.728>

Ziram, dernière mise à jour le 15/07/2019. Consulté sur : <https://echa.europa.eu/fr/substance-information/-/substanceinfo/100.004.808>

Ziram, dernière mise à jour le 18/02/2019. Consulté sur :

<https://ephy.anses.fr/substance/ziram>

Zirame, AGRITOX – Base de données sur les substances actives phytopharmaceutiques, dernière mise à jour le 05/04/2011.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussignée, Nicole HAGEN, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **Alexi VERMOT-DESROCHES** intitulée « **Evaluation des mécanismes toxicocinétiques impliqués dans l'exposition fœtale à un mélange de pesticides sur le modèle de la brebis gravide** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 04/10/2019
Professeure Nicole HAGEN
Enseignant-chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :
Le Directeur par intérim de l'Ecole
Nationale Vétérinaire de Toulouse
Frédéric BOUSQUET

En déléguation,

Caroline LACROUX
Directrice de l'enseignement
et de la vie étudiante.

Vu :
Le Président du jury :
Professeur Roger LEANDRI



Vu et autorisation de l'impression :
Présidente de l'Université Paul Sabatier
Madame Régine ANDRE-OBRECHT

La Présidente de l'Université Paul Sabatier,
par déléguation,
Le Vice-Président de la CVU
Richard CUILET

Mr Alexi VERMOT-DESROCHES
a été admis(e) sur concours en : 2014
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 18/07/2018
a validé son année d'approfondissement le : 03/10/2019
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

TITRE : Evaluation des mécanismes toxicocinétiques impliqués dans l'exposition fœtale à un mélange de pesticides sur le modèle de la brebis gravide.

L'objectif de cette étude est d'évaluer la disposition du mélange de six pesticides utilisés dans l'agriculture, dans l'unité materno-fœto-placentaire, sur le modèle de la brebis gravide instrumentée.

L'étude a montré que le fœtus est peu exposé au chlorpyrifos et au ziram via l'exposition maternelle. Pour le boscalide, le fœtus reçoit une dose rapportée à son poids deux fois supérieure à celle de sa mère, mais cette molécule est rapidement éliminée par le fœtus. Une exposition fœtale prolongée au méthyl-thiophanate ou au thiaclopride est observée, en raison d'un passage placentaire très élevé et d'une faible élimination de ces deux substances du compartiment maternel. Le fœtus est exposé au principal métabolite du captane, le THPI, via une exposition maternelle, mais il est capable d'éliminer très rapidement le THPI.

Cette étude apporte de nouveaux éléments pour l'évaluation du risque lié à l'exposition humaine à ce mélange de pesticides pendant la période critique de la gestation.

MOTS-CLES : Pesticides, toxicocinétique, fœtus, brebis, passage placentaire.

TITLE : Evaluation of toxicokinetic mechanisms determining fetal exposure to a mixture of six pesticides on the model of pregnant ewe.

The aim of this study is to assess the disposition of a mixture of six pesticides used in agriculture, in the materno-feto-placental unit, using the model of the pregnant instrumented ewe.

This study showed that the fetus was slightly exposed to chlorpyrifos and ziram through maternal exposure. For boscalid, the fetus receives a dose related to its weight twice that of its mother, but this molecule was quickly eliminated by the fetus. An extended fetal exposure to thiophanate-methyl and thiacloprid is observed due to the high placental transfer and a low elimination from the maternal compartment. Fetus is exposed to the main metabolite of captan, THPI, through maternal exposure, but is able to eliminate THPI very quickly.

This study provides new data for the evaluation of the risk assessment of human exposure to this mixture of six pesticides during the critical period of pregnancy.

KEY WORDS : Pesticides, toxicokinetic, fetus, ewe, placental transfer.