

Nouvelle approche de spectrométrie de masse haute résolution multiplexée pour une évaluation exhaustive de l'exposition interne aux pesticides

Debrauwer Laurent ⁽¹⁾, Mirmont Elodie ⁽¹⁾, Moufawad Tarek ⁽²⁾, Alem Fatima-Zahra ⁽³⁾, Zhou Houssein ⁽¹⁾, Jamin Emilien ⁽¹⁾, Chevrier Cécile ⁽³⁾, Bonvallot Nathalie ⁽³⁾, Kesse-Guyot Emmanuelle ⁽⁴⁾, Baudry Julia ⁽⁴⁾, Bichon Emmanuelle ⁽²⁾, Guiffard Ingrid ⁽²⁾, Antignac Jean-Philippe ⁽²⁾, David Arthur ⁽³⁾

(1) Toxalim (Research Center in Food Toxicology), Toulouse University, INRAE, ENVT, INP-Purpan, 31027 Toulouse, France – Laurent.debrauwer@inrae.fr

(2) ONIRIS, INRAE, LABERCA, Nantes, 44300, France

(3) Univ Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail), UMR_S 1085, Rennes, France

(4) CRESS – EREN – INRAE, Université Sorbonne Paris Nord, SMBH, 74 rue Marcel Cachin, 93017 Bobigny cedex

Résumé

L'exposition humaine aux contaminants alimentaires et environnementaux, dont l'exposition particulière aux pesticides, est généralement estimée par des méthodes indirectes (modèles d'exposition externe). La bio-surveillance, basée sur des biomarqueurs mesurés à partir d'échantillons biologiques humains, complète cette stratégie en évaluant l'exposition interne des populations et permet d'affiner l'évaluation des risques associés. Les approches conventionnelles dans ce domaine restent toutefois centrées sur un nombre limité de substances connues, et nécessitent des quantités d'échantillons importantes pour conduire de multiples analyses pour couvrir différentes classes de substances.

Ainsi, les risques pour la santé humaine associés à une exposition multiple à des mélanges complexes de pesticides restent actuellement sous-explorés. Dans ce contexte, nous proposons une approche innovante basée sur un workflow intégratif, dérivé des approches métabolomiques, visant à détecter le plus grand nombre possible de marqueurs d'exposition aux pesticides de façon non ciblée en combinant trois plateformes complémentaires de spectrométrie de masse à haute résolution (HILIC-LC-HRMS, C18-LC-HRMS et GC-HRMS). L'originalité de cette approche réside dans le fait de produire, autour du concept d'exposome [1,2] et à partir d'un échantillon unique, des données d'exposition couvrant une large gamme de polarité de pesticides et leurs métabolites à partir du criblage simultané d'un large panel de marqueurs d'exposition (> 1000). Les résultats montrent une plus-value de cette nouvelle approche multiplexée appliquée dans une preuve de concept à des échantillons provenant de deux études épidémiologiques (cohorte mère-enfant PELAGIE et NutriNet-Santé), pour tester des associations avec des paramètres de santé.

Mots-clés : Spectrométrie de masse, exposome, pesticides, miniaturisation

Introduction

L'évaluation des effets de l'exposition aux produits phytopharmaceutiques (PP) sur la santé de l'Homme nécessite de disposer de données d'exposition les plus exhaustives et précises possible, que ce soit pour mettre en évidence des associations avec des événements de santé ou pour évaluer la prévalence de l'exposition aux PP dans la population générale afin de mesurer l'impact des mesures de gestion. L'évaluation de l'exposition aux PP reste une problématique complexe en raison en particulier (i) du

très grand nombre de substances utilisées (et leur variété de propriétés physico-chimiques) et de la multi-exposition qui peut en résulter, (ii) de la diversité des pratiques d'utilisation selon les cultures, et enfin (iii) de la variété des sources d'exposition (air extérieur et intérieur, alimentation et variété des habitudes alimentaires, exposition cutanée, etc...). Cette évaluation est historiquement basée soit à partir de mesures indirectes de l'exposition externe (questionnaires sur les usages, contamination des environnements, approche géographique) soit sur la multiplication d'analyses ciblées réalisées sur un nombre limité de substances dans des matrices biologiques (marqueurs d'exposition). La caractérisation de l'exposome chimique de façon plus exhaustive impose aujourd'hui de changer de paradigme en mettant en œuvre de nouvelles approches de criblage non ciblé à large échelle.

Dans ce contexte une méthodologie innovante basée sur l'utilisation multiplexée de plusieurs méthodes de séparation chromatographique couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS) a été développée pour une couverture maximale de l'exposition interne aux pesticides. L'objectif premier du projet SCREENPEST est de concevoir des outils analytiques permettant de contribuer à la bio-surveillance de demain, pour être capable de fournir des données d'exposition exhaustives et de qualité en changeant d'échelle et en couvrant sans a priori une large gamme de substances. Une approche méthodologique alternative et de rupture est proposée, consistant en un workflow analytique harmonisée de criblage à large échelle de PP et de leurs métabolites ou produits de dégradation, basé sur la HRMS (Fig.1). Ces avancées méthodologiques permettent de s'appuyer sur une vision plus exhaustive de l'exposition aux contaminants chimiques (PP dans le cadre de ce projet) pour améliorer les stratégies de prévention et la prise de décision en matière de politique publique.

Cette approche holistique a été appliquée à deux cas d'étude permettant (i) d'éprouver la méthode développée sur des échantillons biologiques humains, (ii) de générer de nouvelles données d'exposition, et (iii) de tester des associations entre les niveaux d'exposition observés et certains paramètres de santé disponibles dans les études concernées. Pour cela nous nous sommes appuyés d'une part sur l'étude PELAGIE (168 échantillons) [3] afin de tester de manière exploratoire le lien entre l'exposition observée et les paramètres anthropométriques chez l'enfant, et d'autre part sur l'étude NutriNet-Santé (200 échantillons) [4] afin de tester le lien entre l'exposition mesurée et le risque de diabète de type 2.

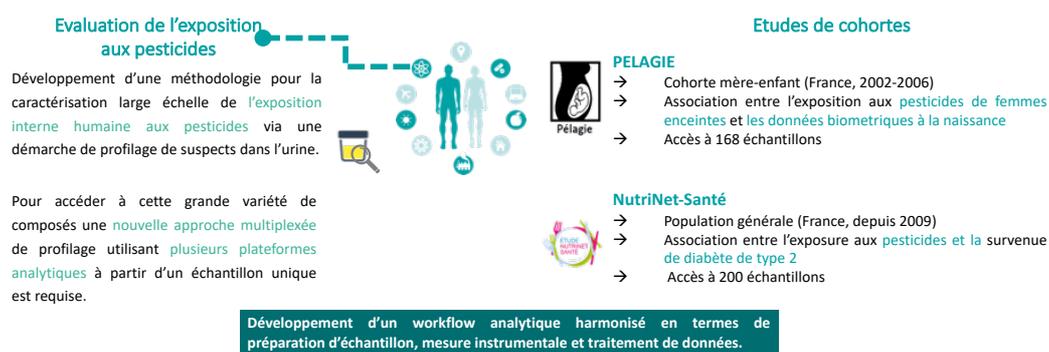


Figure 1 : contexte général du projet SCREENPEST.

Résultats

1- Préparation d'échantillon

Dans un premier temps une liste de composés suspects a été établie pour réaliser les développements analytiques. Ceux-ci ont été choisis pour couvrir une large gamme de poids moléculaires ($72 < PM < 720$) et de polarité ($-4,71 < \text{Log Kow} < 8,38$) et sélectionnés sur des critères de disponibilité commerciale, d'utilisation des pesticides en France (données 2019), d'expertise épidémiologique ainsi qu'à partir de

données déjà disponibles (en particulier provenant du projet Européen HBM4EU auquel les laboratoires ont participé [5,6,7]).

Avec ce jeu de 187 composés au total (+ certains de leurs métabolites), différentes conditions de préparation d'échantillon ont été testées (mode extraction liquide-liquide (LLE) et mode extraction en phase solide (SPE)). Les résultats ont montré que la SPE était la méthode la plus efficace en termes de taux de récupération, répétabilité, effets matrice). Sur la base d'une phase polymérique un fractionnement par éluions successives permet à partir d'une prise d'essai limitée (0,5mL) d'échantillon urinaire de produire des extraits pouvant être distribués sur les différentes plateformes analytiques utilisées.

2- Mesures HRMS

Dans le but de couvrir la plus large gamme possible de polarité des marqueurs d'exposition, 3 plateformes analytiques de spectrométrie de masse haute résolution couplée à la chromatographie ont été utilisées (Fig 2). Il s'agit de la chromatographie en phase gazeuse (GC) pour couvrir la fraction la plus apolaire de l'échantillon, la chromatographie en phase liquide en mode phase inverse (LC-C18) pour les composés de polarité moyenne et enfin de la chromatographie liquide d'interactions hydrophiles (LC-HILIC) pour les composés très polaires, toutes couplées à la HRMS.

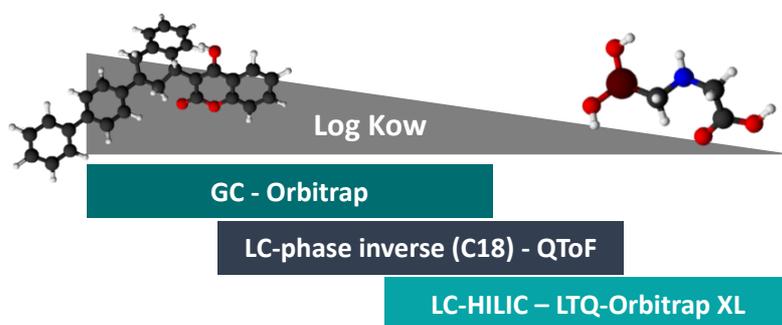


Figure 2 : Approches complémentaires pour une large couverture de l'exposition aux pesticides.

Sur la base des 187 composés sélectionnés pour le développement méthodologique les résultats montrent que 80 d'entre eux sont détectés par les 3 méthodes, et que l'approche multiplexée permet d'élargir le nombre de marqueurs d'exposition par une détection spécifique à l'une des trois plateformes analytiques utilisées. Il reste malgré tout une marge de progression car 11 composés n'ont pu être détectés par aucune des 3 plateformes analytiques utilisées.

3- Traitement des données

Le traitement des données HRMS collectées a été effectué de façon harmonisée entre les 3 laboratoires qui ont généré ces données, avec des outils issus de développements internes « open-source » (e.g. XenoScreener, Scannotation [8,9] W4M MetaboHUB [10]) ou de solutions offertes par les constructeurs (e.g. Trace Finder et/ou Xcalibur Thermo Scientific).

Cette étape cruciale a permis de fournir des matrices de données d'exposition sur un format unique pour leur analyse par les équipes épidémiologistes partenaires du projet. Les matrices harmonisées comportent en lignes les pesticides et métabolites suspects (>2000 dans nos bases de données) et en colonnes les identifiants de ces composés (formule brute, masse exacte, N° CAS, IUPAC, Inchikey, Smile, niveau d'identification selon l'échelle de Schymanski [11]) et l'intensité du signal détecté sur chacun des individus / échantillons.

Ces données sont d'ordre semi-quantitatif, ce qui permet de comparer le niveau d'exposition entre individus sur un même composé marqueur d'exposition. Par contre, à l'heure actuelle et compte tenu des limitations des approches de spectrométrie de masse en absence de standard interne identifié pour chaque composé, cette approche globale ne permet pas de comparer les niveaux d'exposition entre les marqueurs d'exposition aux pesticides pour un même individu (instruments différents, rendements d'ionisation / coefficients de réponses variables d'un composé à l'autre sur un même instrument).

4- Analyse et interprétation des données d'exposition

L'analyse des données d'exposition est en cours et permet aux épidémiologistes de disposer d'une couverture la plus exhaustive possible de l'exposition interne aux pesticides pour une mise en relation avec des données de santé.

Les deux études reposant sur des end-points différents (étude de déterminants d'exposition dans un cas et étude de type cas-témoin dans l'autre), les outils statistiques utilisés ne sont pas les mêmes. Dans le cas de l'étude PELAGIE des méthodes de classification de type NMF sont utilisées pour différencier des profils d'exposition et mettre en relation les déterminants d'exposition avec les données de santé des enfants issus de la cohorte. Sur l'étude NutriNet-Santé, l'analyse des données est effectuée à l'aide de modèles de régression logistique conditionnelle prenant en compte le schéma de l'étude. Des méthodes innovantes de régression pénalisée (elastic net, lasso) sont appliquées pour la sélection des molécules marqueurs de risque. Les données sont actuellement en cours d'analyse et les résultats seront produits prochainement.

Conclusion

Dans ce travail nous avons montré qu'une approche sans a priori permet à partir d'une prise d'essai minimale et unique (0,5 mL d'urine) de réaliser une analyse holistique multiplexée et de couvrir la plus large gamme possible de marqueurs d'exposition interne aux pesticides [12]. Ceci ouvre la voie à de nouvelles approches basées sur l'utilisation de la HRMS et des outils de traitement de données développés en métabolomique et en exposomique pour offrir des solutions innovantes en matière d'évaluation de l'exposition aux PP.

Cette approche présente encore des marges de progrès en termes de technologie (sensibilité des approches non-ciblées vs. ciblées) et de traitement de données (standardisation de l'extraction des signaux, alimentation des bases spectrales, outils chemo-informatiques), mais le nouveau paradigme proposé pose les bases d'une méthodologie holistique d'évaluation de l'exposition interne aux pesticides, pouvant être étendue à de nombreuses autres classes de contaminants (Fig. 3).



Figure 3 : Workflow développé sur la base d'une approche innovante de spectrométrie de masse haute résolution multiplexée pour l'évaluation de l'exposition interne aux pesticides

Remerciements

Ce travail a été financé par l'Office Français de la Biodiversité (OFB) dans le cadre de l'appel à projets de recherche innovation du Plan Écophyto II+ (Contrat OFB 20.0743). Les auteurs tiennent à remercier les 3 post-doctorants financés par le projet (Fatima-Zahra Alem, Elodie Mirmont, Tarek Moufawad) pour leur contribution essentielle aux aspects de développement méthodologique pour le bon déroulement de ce projet. Les financeurs des instruments de spectrométrie de masse utilisés sur ce projet sont également remerciés.

Références

- [1] Wild C.P., 2005. Complementing the genome with an “exposome”: the outstanding challenge of environmental exposure measurement in molecular epidemiology. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 14 (8), 1847-1850.
- [2] David A., Chaker J., Price E.J., Bessonneau V., Chetwynd A.J., Vitale C.M., Klanova J., Walker D.I., Antignac J.P., Barouki R., Miller G.W. 2021. Towards a comprehensive characterisation of the human internal chemical exposome: Challenges and perspectives. *Env. Int.*, 156, 106630.
- [3] Chevrier C., Serrano T., Lecerf R., Limon G., Petit C., Monfort C., Hubert-Moy L., Durand G., Cordier S., 2014. Environmental determinants of the urinary concentrations of herbicides during pregnancy: The PELAGIE mother-child cohort (France). *Env. Int.*, 63, 11-18.
- [4] Baudry J., Debrauwer L., Durand G., Limon G., Delcambre A., Vidal R., Taupier-Letage B., Druesne-Pecollo N., Galan P., Herberg S., Lairon D., Cravedi J.P., Kesse-Guyot E., 2018. Urinary pesticide concentrations in French adults with low and high organic food consumption: results from the general population based NutriNet-Santé. *J. Exp. Sci. Env. Epidemiol.*, 29, 366-378.
- [5] Vitale C.M., Lommen A., Huber C., Wagner K., Molina B.G., Nijssen R., Price E.J., Blokland M., van Tricht F., Mol H.G.J., Krauss M., Debrauwer L., Pardo O., Leon N., Klanova J., Antignac J.P., 2022. Harmonized quality assurance/quality control Provisions for nontargeted measurement of urinary pesticide biomarkers in the HBM4EU multisite SPECIMEn study. *Anal. Chem.*, 94, 7833-7843.
- [6] Meijer J., Lamoree M., Hamers T., Antignac J.P., Hutinet S., Debrauwer L., Covaci A., Huber C., Krauss M., Walker D.I., Schymanski E.L., Vermeulen R., Vlaanderen J., 2021. An annotation database for chemicals of emerging concern in exposome research. *Env. Int.*, 152, 106511.
- [7] Caballero-Casero N., Belova L., Vervliet P., Antignac J.P., Castano A., Debrauwer L., Esteban-Lopez M., Huber C., Klanova J., Krauss M., Lommen A., Mol H.G.J., Oberacher H., Pardo O., Price E.J., Reinstadler V., Vitale C.M., van Nuijs A.L.N., Covaci A., 2021. Towards harmonised criteria in quality assurance and quality control of suspect and non-target LC-HRMS analytical workflows for screening of emerging contaminants in human biomonitoring. *Trends Anal. Chem.*, 136, 116201.
- [8] Chaker J., Gilles E., Léger T., Jégou B., David A., 2021. From metabolomics to HRMS-based exposomics: adapting peak picking and developing scoring for MS1 suspect screening. *Anal. Chem.*, 93, 1792-1800.
- [9] Chaker J., Gilles E., Montfort C., Chevrier C., Lennon S., David A., 2023. Scannotation: A suspect screening tool for the rapid pre-annotation of the human LC-HRMS-based chemical exposome. *Environ. Sci. Technol.*, 57, 19253-19262.
- [10] Giacomoni F., Le Corguille G., Monsoor M., Landi M., Pericard P., Petera M., Duperier C., Tremblay-Franco M., Martin J.F., Jacob D., Goullitquer S., Thevenot E., Caron C., 2015. Workflow4Metabolomics: a collaborative research infrastructure for computational metabolomics. *Bioinformatics*, 31 (9), 1493-1495.
- [11] Schymanski E.L., Jeon J., Gulde R., Fenner K., Ruff M., Singer H.P., Hollender J., 2014. Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: communicating confidence. *Environ. Sci. Technol.*, 48, 2097-2098.
- [12] Debrauwer L., Mirmont E., Moufawad T., Alem F.Z., Zhou H., Jamin E., Chevrier C., Bonvallot N., Kesse-Guyot E., Baudry J., Bichon E., Guiffard I., Antignac J.P., David A., 2024. In preparation.