



HAL
open science

Modélisation de la toxicocinétique des isomères cis et trans de la perméthrine et de ses métabolites chez le rat et de leur métabolisme sur hépatocytes humains

Marie-Émilie Willemin

► **To cite this version:**

Marie-Émilie Willemin. Modélisation de la toxicocinétique des isomères cis et trans de la perméthrine et de ses métabolites chez le rat et de leur métabolisme sur hépatocytes humains. Biomécanique [physics.med-ph]. Université de Technologie de Compiègne, 2014. Français. NNT : 2014COMP2149 . tel-01127586

HAL Id: tel-01127586

<https://theses.hal.science/tel-01127586>

Submitted on 7 Mar 2015

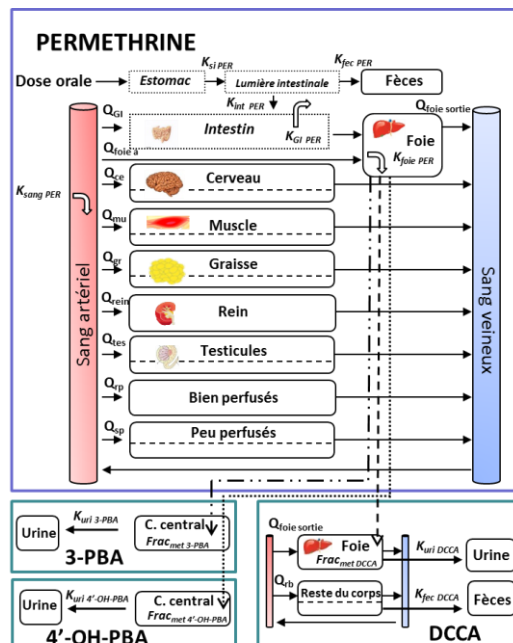
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Par **Marie-Emilie WILLEMIN**

Modélisation de la toxicocinétique des isomères cis et trans de la perméthrine et de ses métabolites chez le rat et de leur métabolisme sur hépatocytes humains

Thèse présentée
pour l'obtention du grade
de Docteur de l'UTC



Soutenue le 21 novembre 2014
Spécialité : Biomécanique, Bio-ingénierie

Modélisation de la toxicocinétique des isomères *cis* et *trans* de la perméthrine et de ses métabolites chez le rat et de leur métabolisme sur hépatocytes humains

Soutenue le 21 novembre 2014 devant le jury composé de :

Mme. BROCHOT Céline (Directrice de thèse)

M. EMOND Claude (Rapporteur)

Mme. KLIEBER Sylvie (Examinatrice)

M. LECLERC Eric (Directeur de thèse)

Mme. LEGALLAIS Cécile (Président)

M. SANDERS Pascal (Rapporteur)

REMERCIEMENTS

Je tiens à adresser mes remerciements à Céline Brochot et Eric Leclerc qui ont permis à ce projet de voir le jour.

Je remercie Eric Leclerc pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse.

Je remercie sincèrement Céline Brochot pour son encadrement, sa rigueur scientifique, sa disponibilité et son soutien durant ces trois ans. Merci de m'avoir permise de travailler sur autant de domaines dans ce projet, pour les collaborations effectuées et de m'avoir laissée libre dans mon organisation.

J'adresse mes remerciements à Claude Emond et Pascal Sanders d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse ainsi qu'à Cécile Legallais et Sylvie Klieber pour avoir accepté de faire partie de mon jury.

Je remercie aussi Alexandre Péry et Céline Brochot, Anne Braun, Olivier Aguerre-Chariol, Roger Rhamani de m'avoir permise de mener à bien mes recherches aussi bien en modélisation, en expérimentation animale, en chimie analytique et en expérimentation *in vitro* au sein de leur unité. Merci à la Fondation UTC d'avoir financé ce projet.

Je tiens à remercier aussi l'ensemble des personnes ayant contribué à ce travail. Une thèse multidisciplinaire requiert l'aide de personnes spécialistes dans leur domaine :

Merci à Claudine, François, Jérôme et Hervé pour votre aide technique en analytique et votre patience

Merci à Sophie, Franck et Anthony pour votre bonne humeur lors des expérimentations animales

Merci à Ali pour ton aide précieuse en analytique (et en mécanique...) et ton soutien moral

Merci à Georges pour ton aide dans la réalisation des expériences *in vitro* et ta patience

Un grand merci aussi à l'ensemble de l'unité METO, Enrico, Rémy, Cléo et Florence pour les qualités scientifiques dont vous faites preuve dans votre travail et pour avoir su (entre autres) m'éveiller à l'écologie : un merci particulier à Florence pour ton aide au début de ma thèse.

Merci à toutes les personnes que j'ai rencontrées grâce à cette thèse, et qui m'ont aidée de près ou de loin, scientifiquement et (ou) moralement, dans mon travail, ou pour avoir fait tout simplement preuve de bonne humeur : Sophie, Benoît, Goulwen, Antonio, Jérémy, Charlène, Marie, Nadia, Edlyn et Héloïse pour la Picardie et Ludo, Laura, Olivier, Romain et Olga pour le Sud !

Je tiens à remercier celles et ceux qui ont participé à la relecture du manuscrit.

Merci à mes ami(e)s pour votre présence et m'avoir changée les idées durant ces trois ans. Un merci particulier pour celles qui étaient aussi en thèse durant cette période pour votre aide morale et parfois scientifique. Merci à toutes d'être venues me voir « là-haut » en Picardie ou à Antibes.

Un sincère merci à mes proches, ma famille pour m'avoir soutenue durant ces trois ans de thèse et surtout m'avoir écoutée avec patience, sans toujours tout comprendre je pense. En espérant que maintenant vous saurez ce que veut dire PBPk.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES	13
LISTE DES TABLEAUX	19
ABREVIATIONS	25
INTRODUCTION GENERALE.....	31
ETAT DE L'ART.....	37
I. EVALUATION DU RISQUE LIE A L'EXPOSITION AUX PYRETHRINOÏDES	37
I.1. Caractéristiques chimiques.....	37
I.2. Une famille d'insecticides ubiquitaire à large utilisation	38
I.1.a. Une famille d'insecticides à utilisations multiples.....	39
I.1.b. De nombreuses sources d'exposition.....	39
I.1.c. Une population fortement exposée	40
I.2. La toxicocinétique <i>in vivo</i> des pyréthriinoïdes.....	43
I.3. Des effets toxiques neuronaux et hormonaux recensés	46
I.3.a. Un mécanisme d'action basé sur la modification de la transmission nerveuse chez l'insecte.....	46
I.3.b. Des effets toxiques recensés chez les mammifères	47
I.3.b.i. Toxicité neuronale.....	48
I.3.b.ii. Perturbation hormonale	49
I.3.b.iii. Autres signes de toxicité	50
I.4. Place de la perméthrine parmi les pyréthriinoïdes	51
II. GENERATION ET MODELISATION DE DONNEES DE CINETIQUE <i>IN VIVO</i>	52
II.1. Démarche du développement d'une méthode analytique	52
II.1.a. Mise au point d'une méthode analytique	52
II.1.b. Critères d'évaluation de la performance d'une méthode analytique	54
II.1.c. Méthodes analytiques développées pour quantifier les pyréthriinoïdes et leurs métabolites.....	55
II.2. Elaboration des études de toxicocinétiques <i>in vivo</i>	57
II.3. Analyse des données cinétiques via les modèles PBPK	58
II.3.a. Structure d'un modèle PBPK	58
II.3.b. Mise en équation des processus ADME	60
II.3.b.i. Absorption	60

TABLE DES MATIERES

II.3.b.ii.	<i>Distribution</i>	61
II.3.b.iii.	<i>Métabolisme</i>	63
II.3.b.iv.	<i>Excrétion</i>	64
II.3.c.	Paramétrisation des modèles PBPK	64
II.3.c.i.	<i>Paramètres observables</i>	64
II.3.c.ii.	<i>Estimation in vitro des paramètres</i>	65
II.3.c.iii.	<i>Estimation QSAR des paramètres</i>	65
II.3.c.iv.	<i>Estimation statistique des paramètres</i>	66
II.3.d.	Evaluation des modèles PBPK	67
II.3.e.	Utilisation des modèles PBPK dans l'évaluation du risque	68
II.3.e.i.	<i>Extrapolation à des conditions réelles d'exposition</i>	68
II.3.e.ii.	<i>Couplage à des modèles de toxicodynamie</i>	69
II.3.e.iii.	<i>Prédiction de l'exposition externe</i>	70
II.3.e.iv.	<i>Couplage à d'autres modèles PBPK</i>	70
II.4.	Modèles PBPK publiés sur les pyréthriinoïdes	71
II.4.a.	Structure des modèles PBPK des pyréthriinoïdes	71
II.4.b.	Validation des modèles PBPK des pyréthriinoïdes chez l'homme	73
III.	EXTRAPOLATION INTER-ESPECE DU METABOLISME <i>IN VITRO</i>	75
III.1.	Méthodes de génération et d'analyse des données de métabolisme <i>in vitro</i>	75
III.1.a.	Principe des études <i>in vitro</i> de quantification du métabolisme	75
III.1.a.i.	<i>Substances séparées</i>	75
III.1.a.ii.	<i>Co-incubation</i>	76
III.1.b.	Choix expérimentaux pour améliorer l'extrapolation <i>in vitro-in vivo</i>	78
III.1.b.i.	<i>Choix du matériel cellulaire</i>	78
III.1.b.ii.	<i>Evaluation des liaisons aspécifiques</i>	79
III.1.b.iii.	<i>Caractérisation de l'activité du lot</i>	81
III.1.c.	Méthodes pour l'amélioration de l'analyse des données <i>in vitro</i>	81
III.2.	Conditions d'extrapolation des données <i>in vitro</i>	83
III.3.	Données <i>in vitro</i> sur les pyréthriinoïdes	84
III.3.a.	Identification des voies métaboliques des pyréthriinoïdes	84
III.3.a.i.	<i>Hydrolyse</i>	85
III.3.a.ii.	<i>Oxydation</i>	86
III.3.b.	Quantification du métabolisme de la perméthrine chez le rat et l'homme	88
OBJECTIFS	93	
I. METHODE DE DOSAGE DE LA PERMETHRINE ET DE SES METABOLITES	97	
Determination of <i>cis-</i>, <i>trans</i>-permethrin and associated metabolites in rat blood and organs by gas chromatography ion trap mass spectrometry	99	
Abstract	99	
Introduction	101	
Experimental	103	

Results and discussion	107
Conclusion.....	115
References	116
II. DEVELOPPEMENT D'UN MODELE PBPK DE LA PERMETHRINE ET DE SES METABOLITES CHEZ LE RAT	119
Development of a rat PBPK model of <i>cis</i>- and <i>trans</i>-permethrin and their metabolites <i>cis</i>- or <i>trans</i>-DCCA, 3-PBA and 4'-OH-PBA	121
Abstract.....	121
Introduction	122
Experimental.....	125
Results.....	135
Discussion	140
Conclusion.....	141
References	142
III. QUANTIFICATION <i>IN VITRO</i> DU METABOLISME HEPATIQUE DE LA PERMETHRINE ET DES SES METABOLITES CHEZ L'HOMME	145
<i>In vitro</i> human metabolism of permethrin isomers alone or as a mixture and the formation of the major metabolites in cryopreserved primary hepatocytes	147
Abstract.....	147
Introduction	149
Experimental.....	150
Results.....	155
Discussion	159
References	162
DISCUSSION GENERALE & PERSPECTIVES	167
REFERENCES	175
ANNEXES.....	193
Annexe A. Equations du modèle PBPK perméthrine et de ses métabolites chez le rat	193
Annexe B. Epreuves auteur « La modélisation toxico-pharmacocinétique à fondement physiologique : son rôle en évaluation du risque et en pharmacologie ».	197
Annexe C. Valorisation des travaux	237

Liste des Figures

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Représentation des six pyréthrine naturelles.....	37
Figure 2. Evolution structurale des pyréthrinoïdes de synthèse.....	38
Figure 3. Présentation des différentes sources et voies d'exposition à la famille des pyréthrinoïdes (adapté de Santé Canada (2010)).....	40
Figure 4. Pyréthrinoïdes et leurs métabolites associés. Les métabolites en bleu sont ceux recherchés lors des études de biosurveillance (adapté d'Ueyama <i>et al.</i> (2010b)).....	41
Figure 5. Distribution des concentrations en métabolites de pyréthrinoïdes dosés dans les urines d'un échantillon (n = 396) d'une population adulte (18-74 ans) considérée comme non exposée aux pyréthrinoïdes (InVS 2013).....	41
Figure 6. Représentation de l'ensemble des voies métaboliques empruntées par la <i>cis</i> - et <i>trans</i> -perméthrine chez les mammifères (Gaughan <i>et al.</i> 1977).....	44
Figure 7. Modification de la polarisation de la membrane et de la génération du potentiel d'action à l'état basal et suite à une exposition aux pyréthrinoïdes (adapté de Shafer <i>et al.</i> (2005)).....	47
Figure 8. Les quatre stéréoisomères de la perméthrine	51
Figure 9. Schéma général de l'analyse d'un composé par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse.....	52
Figure 10. Principe de la fragmentation des composés par un spectromètre de masse (MS) en tandem	53
Figure 11. Cage à métabolisme pour le rat	57
Figure 12. Les différentes étapes de construction et de développement d'un modèle PBPK.....	58
Figure 13. Exemple de modèle PBPK comprenant différents sites d'absorption et d'excrétion.....	59
Figure 14. Représentation des échanges alvéolaires entre le sang et l'air. Les paramètres F_{card} , F_{alv} et F_{pul} sont respectivement les flux sanguins cardiaque, alvéolaire et pulmonaire. C_{alv} , C_{art} , C_{ven} , C_{inh} et C_{exh} correspondent respectivement à la concentration dans le sang alvéolaire, artériel et veineux et dans l'air inhalé et exhalé.....	61
Figure 15. Représentation de la distribution du composé dans un organe à perfusion limitée (A) et un organe à diffusion limitée (B). C désigne les concentrations dans, respectivement, l'artère (C_A), le tissu (C_T), la veine (C_V), l'espace extracellulaire ($C_{E,T}$) et intracellulaire ($C_{I,T}$). V_T correspond au volume tissulaire et PA_T au coefficient de perméabilité entre les deux sous compartiments	63
Figure 16. Mise en œuvre de la calibration bayésienne d'un modèle PBPK.....	67
Figure 17. Structure du modèle PBPK de la perméthrine développé par Tornero-Velez <i>et al.</i> (2012). 72	

Figure 18. Représentation de la cinétique de Michaelis-Menten exprimant la vitesse de formation du métabolite en fonction des concentrations d'incubation.....	76
Figure 19. Différents supports cellulaires pouvant être obtenus à partir d'un foie	79
Figure 20. Représentation schématique des différents processus déterminant la disponibilité du composé dans le puits (adapté de Kramer <i>et al.</i> (2012) et Pelkonen <i>et al.</i> (2007))	80
Figure 21. Exemples de représentation graphique pour la détermination des valeurs des paramètres V_{max} et K_m	82
Figure 22. Facteurs d'échelle à appliquer à la CL_{int} <i>in vitro</i> pour obtenir la CL_{int} <i>in vivo</i> hépatique	83
Figure 23. Schéma des différentes étapes de formation du 3-PBA à partir du 3-PBAIc avec les enzymes impliquées chez le rat et l'homme	87
Figure 24. Représentation de l'ensemble des voies métaboliques empruntées par la <i>cis</i> - et <i>trans</i> -perméthrine chez les mammifères (Gaughan <i>et al.</i> 1977).....	87
Figure 25. Metabolic pathway of permethrin with the formation of 3-phenoxybenzoic acid (3-PBA) and 3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethyl-(1-cyclopropane) carboxylic acid (DCCA).....	100
Figure 26. Chromatogram in selected ion monitoring mode of a standard solution for permethrin and derivatized metabolites (each 100 ng/ml)	106
Figure 27. Examples of mass spectra obtained for target analytes: a) Full scan mass spectrum for <i>cis</i> -permethrin, b) full scan mass spectrum of derivatized <i>trans</i> -DCCA, c) daughter full scan spectrum obtained for the m/z 183 ion of <i>cis</i> -permethrin and d) daughter full scan spectrum obtained for the m/z ion 187 of derivatized <i>cis</i> -DCCA	106
Figure 28. Chromatograms obtained after extraction in plasma for (a) <i>cis</i> -DCCA and <i>trans</i> -DCCA, (b) 3-PBA and (c) <i>cis</i> -permethrin, and for <i>cis</i> -permethrin in (d) muscle and (e) fat.....	110
Figure 29. <i>cis</i> -Permethrin (<i>cis</i> -P) (dots), <i>trans</i> -permethrin (<i>trans</i> -P) (crosses), 3-PBA (squares), <i>cis</i> -DCCA (diamonds) and <i>trans</i> -DCCA (triangles) concentration versus time profiles in blood (A), plasma (B) and red blood cells (C) after an oral administration of 5 mg/kg (dashed line) and 20 mg/kg (solid line) doses of <i>cis</i> -permethrin or <i>trans</i> -permethrin. Mean values \pm standard deviation (SD) for $n = 2$ at each time point except for point marked with an asterisk ($n = 1$).....	112
Figure 30. <i>cis</i> -Permethrin (<i>cis</i> -P) concentration versus time profiles in liver (A), brain (B), muscle (C), kidney (D) and testes (E) after an oral administration of 5 mg/kg (dashed line) and 20 mg/kg (solid line) doses of <i>cis</i> -permethrin. Mean values \pm SD for $n = 2$ at each time-point except for point marked with an asterisk ($n = 1$)	114
Figure 31. <i>cis</i> -Permethrin (<i>cis</i> -P) and <i>trans</i> -permethrin (<i>trans</i> -P) concentration versus time profiles in fat after an oral administration of 5 mg/kg (dashed line) and 20 mg/kg (solid line) of <i>cis</i> -permethrin or <i>trans</i> -permethrin. Mean values \pm SD for $n = 2$ at each time point	114
Figure 32. Pyrethroids and their metabolites (framed compounds) commonly dosed in biomonitoring studies. This figure is adapted from Starr <i>et al.</i> (2012).....	123
Figure 33. PBPK model of <i>cis</i> - and <i>trans</i> -permethrin and their metabolites <i>cis</i> - and <i>trans</i> -DCCA, 3-PBA and 4'-OH-PBA with an oral exposure. Distribution in brain, muscle, fat, testes and slowly perfused tissues of parent compounds and in rest of body of DCCA is represented as diffusion limited	

- compartment and distribution in other organ as flow limited compartments. 3-PBA, DCCA, 4'-OH-PBA are formed in liver. 124
- Figure 34. Metabolism of *cis/trans*-permethrin in rats. Permethrin is hydrolyzed mainly in blood and liver with a possible oxidation before (Gaughan *et al.*, 1977). *Cis/trans*-DCCA and 3-PBA (framed compounds) are metabolites related to permethrin commonly dosed in biomonitoring studies. Derived from Choi *et al.* (2002), Hirose *et al.* (2011), Nakamura *et al.* (2007), Ross *et al.* (2006) and Scollon *et al.* (2009)..... 126
- Figure 35. Kinetic of observed concentrations of *cis*-permethrin (closed square) and *trans*-permethrin (open square) and estimated concentrations of *cis*-permethrin (black solid line) and *trans*-permethrin (grey solid line) in blood, liver, kidney, brain, testes, muscle and fat. The blue solid line stands for the LOQ of permethrin. 134
- Figure 36. Kinetic of observed concentrations of *cis*-DCCA (▲) and *trans*-DCCA (Δ) and estimated concentrations of *cis*-DCCA (— —) and *trans*-DCCA (— —) in blood and liver. The blue dotted line (— —) stands for the LOQ of DCCA. 136
- Figure 37. Kinetics of observed concentrations of metabolites 4'-OH-PBA (◇), DCCA (Δ) and 3-PBA (○) and estimated concentrations of 4'-OH-PBA (.), DCCA (— —) and 3-PBA (— . . —) in urine. Closed symbols and black lines are related to *cis*-permethrin and open symbols and grey lines to *trans*-permethrin. 136
- Figure 38. Observed concentrations in blood, liver, brain and fat after an oral dose of 0.4 mg/kg (a) and 4 mg/kg (b) in *cis*-permethrin (■) and 0.6 mg/kg (c) and 6 mg/kg (d) in *trans*-permethrin (□). The results of predicted concentrations with the values of parameter estimated with the rat PBPK model of permethrin of Tornero-Velez *et al.* (2012) (— —), with our PBPK model of permethrin and metabolites (—) and with our PBPK model with absorption rate fixed to values of Tornero-Velez *et al.* (2012) (—) are also represented..... 138
- Figure 39. A simplified representation of the pathways of metabolism of *cis*-permethrin and *trans*-permethrin into the metabolites *cis/trans*-DCCA and 3-PBA commonly dosed in biomonitoring studies. Derived from Scollon *et al.* (2009), Ross *et al.* (2006), Choi *et al.* (2002), Takaku *et al.* (2011) 148
- Figure 40. Saturation kinetic profiles of the depletion of permethrin (◇) and the formation of 3-PBA (○) and DCCA (□) in human primary hepatocytes. Open and closed figures are respectively related to the *cis* and *trans* isomers. Black solid line (—) and grey solid lines (—) stand respectively for the average, the 5th and 95th percentiles value of the estimated rates. 154
- Figure 41. Kinetics of *cis*- and *trans*-permethrin (◇) and its metabolites *cis*- and *trans*-DCCA (□) and 3-PBA (○) for an incubation of *cis*-permethrin and *trans*-permethrin at 2 μM and 3 μM respectively. Closed signs/solid lines and open signs/dotted lines are related to the conditions of incubation alone and in mixture, respectively. Concentrations of 3-PBA formed from *cis*-permethrin (●), *trans*-permethrin (●) and from the both isomers (●) are also represented. 156
- Figure 42. Effect on metabolism of *trans*-permethrin (respectively *cis*-permethrin) (5 μM) incubated with different concentrations of *cis*-permethrin (respectively *trans*-permethrin) at respectively 3 h (A) and 4 h (B) 158

Liste des Tableaux

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Valeur médiane (95 ^{ème} percentile) des concentrations urinaires ($\mu\text{g/L}$) en les métabolites 3-PBA, <i>cis</i> -DCCA, <i>trans</i> -DCCA, DBCA et F-PBA d'un échantillon de la population adulte française, allemande, canadienne, américaine et japonaise.....	42
Tableau 2. Pourcentage de radioactivité retrouvé dans les urines et les fèces après l'administration des formes séparées (1RS) <i>trans</i> -perméthrine et (1RS) <i>cis</i> -perméthrine chez le rat (Gaughan <i>et al.</i> 1977).....	45
Tableau 3. Pourcentage de radioactivité dans les urines et les fèces à 24 h en composés parents et métabolites après l'administration orale des formes séparées (1RS) <i>trans</i> -perméthrine et (1RS) <i>cis</i> -perméthrine chez le rat (Gaughan <i>et al.</i> 1977)	45
Tableau 4. Toxicité aiguë intracérébrale (DL 50) en différents pyréthriinoïdes chez la souris.....	47
Tableau 5. Classification simplifiée des pyréthriinoïdes selon leur structure et les effets toxiques provoqués chez l'animal.....	48
Tableau 6. Etudes menées sur la souris et le rat pour évaluer la toxicité sur la reproduction suite à une exposition aux pyréthriinoïdes.....	50
Tableau 7. Valeurs des LOD et LOQ du 3-PBA, <i>cis</i> -DCCA, <i>trans</i> -DCCA, <i>trans</i> -perméthrine et <i>cis</i> -perméthrine obtenues dans des matrices biologiques liquides (urine, sang, plasma) et solides (cerveau, foie, graisse) par différentes techniques d'analyses	56
Tableau 8. Etudes <i>in vivo</i> d'exposition à différents pyréthriinoïdes menées chez l'homme.....	73
Tableau 9. V_{max} et K_m apparents obtenus lors d'une inhibition compétitive, incompétitive, non compétitive et mixte	77
Tableau 10. Caractéristiques des systèmes <i>in vitro</i> hépatiques utilisés dans les études de métabolisme (adapté de Lipscomb <i>et al.</i> (2008) et Yoon <i>et al.</i> (2012)).....	79
Tableau 11. Réactions utilisées pour caractériser l'activité d'une enzyme, basé sur Yuan <i>et al.</i> (2002)	81
Tableau 12. Valeurs de référence pour l'extrapolation <i>in vitro-in vivo</i> chez le rat et l'homme (Lipscomb and Poet 2008).....	84
Tableau 13. Expression des familles CES1 et CES2 selon les tissus chez le rat et l'homme (Satoh and Hosokawa 2010).....	85
Tableau 14. Sites d'hydrolyse des pyréthriinoïdes chez le rat et l'homme avec les enzymes impliquées	85
Tableau 15. Pourcentage de métabolisme par isoforme de CYP450 chez le rat et l'homme de la <i>cis</i> - et <i>trans</i> -perméthrine (Scollon <i>et al.</i> 2009).....	86

Tableau 16. Valeurs des paramètres V_{max} (nmol/min/mg prot ou mL sérum), K_m (μ M) et du ratio V_{max}/K_m (mL/min/mg prot ou mL sérum) de l'hydrolyse de la <i>cis</i> - et <i>trans</i> -perméthrine obtenus sur sérum de rat et microsomes et cytosol hépatiques de rat et d'homme, issues de Crow <i>et al.</i> (2007) (a) et Ross <i>et al.</i> (2006) (b)	88
Tableau 17. Activités spécifiques du plasma, de fraction cellulaire de l'intestin, du foie et du poumon (nmol/min/mg prot) sur la <i>cis</i> - et <i>trans</i> -perméthrine chez le rat (issues de Nakamura <i>et al.</i> (2007) (a) et Crow <i>et al.</i> (2007) (b))	89
Tableau 18. Valeurs moyennes avec l'intervalle à 95 % des paramètres V_{max} (nmol/min/mg prot), K_m (μ M) et du ratio V_{max}/K_m (mL/min/mg prot) de la <i>cis</i> - et <i>trans</i> -perméthrine obtenues sur microsomes hépatiques de rat (Scollon <i>et al.</i> , 2009)	90
Tableau 19. Valeurs de clairance intrinsèque <i>in vivo</i> (μ L/min/kg) de la <i>cis</i> - et <i>trans</i> -perméthrine obtenues sur microsomes hépatiques en présence de NADPH de rat et d'homme (Scollon <i>et al.</i> , 2009)	90
Tableau 20. Settings for detection target analytes by ion trap tandem mass spectrometry	106
Tableau 21. Intraday (n= 10 - 12) and interday (n = 32 - 36) accuracy and precision of the analytical method at 100 and 600 ng/mL doses of <i>cis</i> -permethrin, <i>trans</i> -permethrin, 3-PBA and a mixture of <i>cis</i> -DCCA and <i>trans</i> -DCCA in methanol.....	108
Tableau 22. Recovery (%) after extraction in the different matrices (n = 3) spiked with a 500 ng/mL dose of <i>cis</i> -permethrin, <i>trans</i> -permethrin, <i>cis</i> - and <i>trans</i> -DCCA and 3-PBA.....	108
Tableau 23. Physiological parameters for PBPK models of <i>cis</i> - and <i>trans</i> -permethrin and metabolites <i>cis</i> - and <i>trans</i> -DCCA in rats	128
Tableau 24. Distribution of <i>cis</i> - and <i>trans</i> -permethrin specific parameters of the PBPK model in rats. All prior distributions of parameters are a truncated normal distribution represented by the average value +/- SD and their boundaries. Posterior distributions are represented by the mean with the 2.5 th and 97.5 th percentiles.....	130
Tableau 25. Distribution of specific parameters of <i>cis</i> - and <i>trans</i> -DCCA, 3-PBA and 4'-OH-PBA for PBPK model in rats. The prior distributions of all parameters are a truncated normal one represented by the average value +/- SD and their boundaries, except the rate of formation of metabolites represented by a uniform distribution. Posterior distributions are represented by the mean with the 2.5 th and 97.5 th percentiles.....	132
Tableau 26. Pharmacokinetic parameter the half-life of residence ($T_{1/2}$) of <i>cis</i> - and <i>trans</i> -permethrin and its metabolites <i>cis</i> - and <i>trans</i> -DCCA in blood, brain, fat, kidney, liver, muscle and testes determined on estimated concentrations	134
Tableau 27. Average and standard deviation of values of the pharmacokinetic parameters the area under the curve of the observed concentrations (AUC_{obs}) and the estimated concentrations (AUC_{est}) (μ g.h/mL) of <i>cis</i> - and <i>trans</i> -permethrin and <i>cis</i> - and <i>trans</i> -DCCA vs times in blood, brain, fat, kidney, liver, muscle and testes.....	136
Tableau 28. Results of RMSE scores computed on blood, hepatic, brain and fat concentrations obtained by simulations of <i>cis</i> and <i>trans</i> -permethrin at the dose of the specific isomer at 1 mg/kg and 10 mg/kg with the ratio 40:60. Condition A and B corresponds to values of parameters estimated	

respectively with the PBPK model of permethrin (Tornero-Velez <i>et al.</i> (2012)) and with the PBPK model of permethrin and its metabolites when absorption rates are fixed at ones of Tornero-Velez <i>et al.</i> (2012).	139
Tableau 29. The non specific adsorption (%) of <i>cis</i> - and <i>trans</i> -permethrin on polypropylene tubes and on wells containing cells (n = 3)	154
Tableau 30. Estimated values (average \pm standard deviation) of the kinetic constants V_{max} and K_m and the ratio V_{max}/K_m of the depletion of <i>cis</i> -permethrin and <i>trans</i> -permethrin and the formation of 3-PBA, <i>cis</i> -DCCA and <i>trans</i> -DCCA in human primary hepatocytes	158
Tableau 31. Intrinsic clearances (average \pm standard deviation) of depletion of <i>cis</i> -permethrin and <i>trans</i> -permethrin and the rate of formation of its metabolites 3-PBA, <i>cis</i> -DCCA and <i>trans</i> -DCCA, alone and as a mixture of 2 μ M of <i>cis</i> -permethrin and 3 μ M of <i>trans</i> -permethrin in human primary hepatocytes	158

Abréviations

ABREVIATIONS

ACAT	Modèle compartimental avancé d'absorption et du transit (<i>en</i> : Advanced Compartmental Absorption and Transit)
ADAM	Modèle avancé de dissolution, absorption et métabolisme (<i>en</i> : Advanced Dissolution, Absorption, Metabolism)
ADH	Alcool déshydrogenase
ADME	Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion
ALDH	Aldéhyde déshydrogenase
ATSDR	Agence pour l'enregistrement des substances toxiques et des maladies (<i>en</i> : Agency for Toxic Substances and Disease Registry)
C	Choréo-athétose
CAT	Modèle compartimental d'absorption et du transit (<i>en</i> : Compartmental Absorption and Transit)
CDCA	Acide chrysanthémumdicarboxylique
CE	Carboxylestérase
CL	Clairance
CYP	Cytochrome P450
DBCA	Acide <i>cis</i> -3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-diméthylcyclopropane carboxylique
DCCA	Acide 3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-diméthylcyclopropane carboxylique
DL 50	Dose létale 50
ECD	Détecteur à capture d'électrons
ECMS	Enquête canadienne sur la mesure de la santé
EFSA	Autorité européenne de la sécurité des aliments (<i>en</i> : European Food Safety Authority)
ELFE	Etude longitudinale française depuis l'enfance
ENNS	Etude nationale nutrition santé
ERDEM	Modèle d'estimation de l'exposition reliée à la dose (<i>en</i> : Exposure Related Dose Estimating Model)
FBS	Sérum de veau foetal
FMO	Monooxygénase à flavine
F-PBA	Acide 4-fluoro-3-phénoxybenzoïque
hCE	Carboxylestérase humaine
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
HRMS	Spectromètre de masse à haute résolution
GC	Chromatographie gazeuse

GSH	gluthation
InVS	Institut national de veille sanitaire
IC 50	Concentration inhibitrice médiane (<i>en</i> : half maximal inhibitory concentration)
IVIVE	Extrapolation <i>in vitro-in vivo</i>
K_i	Constante d'inhibition
K_m	Constante d'affinité
LH	Hormone lutéïnisante
LOD	Limite de détection
LOQ	Limite de quantification
m/z	Rapport masse/charge
MCMC	Monte Carlo par Chaînes de Markov
MS	Spectromètre de masse
NAPDH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NHANES	Etude nationale sur la santé et la nutrition (<i>en</i> : National Health and Nutrition Examination Survey)
3-PBA	Acide 3-phénoxybenzoïque
3-PBAIc	Alcool 3-phénoxybenzyle
3-PBAId	Aldéhyde 3-phénoxybenzyle
PBPK	Modèles pharmacocinétique à fondement physiologique (<i>en</i> : Physiologically Based Pharmacokinetic)
p	Perméthrine
PA	Coefficient de perméabilité
PBS	Tampon phosphate
PC	Coefficient de partage
pc	Poids corporel
PCB	Polychlorobiphényles
per	Perméthrine
PNP	4-paranitrophénol
PNPA	4-paranitrophénol acétate
prot	Protéine
QSAR	Relation quantitative structure à activité (<i>en</i> : Quantitative Structure-Activity Relationship)
r	recombinant
RBC	Globule rouge (<i>en</i> : Red blood cells)
SD	Ecart-type (<i>en</i> : Standard deviation)
SHEDS	Exposition humaine stochastique et de simulation de dose (<i>en</i> : Stochastic Human Exposure and Dose Simulation)
T	tremblements

UGT	glucuronosyltransférase
US EPA	Agence américaine de protection de l'environnement (<i>en</i> : United States Environmental Protection Agency)
UV	Ultra-violet
V_{max}	Vitesse maximale de la réaction

Introduction générale

INTRODUCTION GENERALE

Dans les années 1950, de nombreux produits ont été créés pour répondre aux nouvelles habitudes de consommation de la population. Très rapidement entrés dans la vie quotidienne, ces différents produits transformés sont souvent composés des mêmes molécules chimiques. Après quelques décennies, une augmentation des perturbations de l'écosystème et de la santé humaine a été observée (Kortenkamp 2008; 2000). L'implication des nouvelles molécules chimiques dans ces effets néfastes a alors été suspectée. La réglementation concernant la mise sur le marché de nouvelles substances était en effet moins stricte qu'actuellement, en particulier en terme de toxicité sur la santé humaine et l'environnement. Peuvent être cités en exemple les polychlorobiphényles (PCBs), dont la toxicité est largement reconnue (Kimbrough 1995). Ces substances chimiques ont été très utilisées jusque dans les années 1970 dans les condensateurs électriques, les fours à micro-ondes, les adhésifs, les additifs d'huiles minérales.... Au niveau physiologique, des perturbations de la reproduction, des malformations génitales et des anomalies lors du développement *in utero* après une exposition chronique ont été observées (ATSDR 2000; Lamb *et al.* 2006; Weisglas-Kuperus *et al.* 2000). La fabrication et l'utilisation des PCBs sont interdites en France depuis 1987.

Par conséquent, plusieurs stratégies ont été mises en place pour limiter les risques liés aux molécules chimiques, nouvellement développées ou non. En Europe, en 2006, la directive « Enregistrement, évaluation, autorisation et restriction des produits chimiques » (REACH, pour « Registration, Evaluation, Authorization and restriction of CHemicals »), proposée par le Parlement Européen et le Conseil de l'Union Européenne, a été adoptée. L'objectif était d'améliorer la protection de la santé humaine et de l'environnement envers les substances chimiques. Elle vise à faire évaluer par l'industriel la toxicité d'un composé et à en prouver son innocuité. Les substances concernées sont celles déjà commercialisées ou nouvellement développées et doivent être fabriquées ou importées à plus d'une tonne par an.

Parallèlement, émergée dans les années 1990, la discipline qu'est l'évaluation du risque permet d'évaluer et de quantifier les effets potentiels sur la santé et l'environnement suite à l'exposition à des substances chimiques ou des agents physiques (US EPA 2004). Sont concernés les composés présents dans la nourriture, les additifs, les médicaments, les contaminants environnementaux, mais aussi les radiations et les champs magnétiques. L'objectif est de fournir aux gestionnaires du risque (autorités gouvernementales, industrielles ou encore sanitaires) les éléments nécessaires pour la gestion de leur utilisation. Plusieurs paramètres rentrent en jeu. Le risque auquel la population et l'environnement sont exposés et les incertitudes sous-jacentes doivent d'abord être connus. Puis, les facteurs économiques et sociaux associés doivent être pris en compte (NRC 2007; US EPA 2004). Dans cette optique, des lignes directrices ont été élaborées par l'agence sanitaire américaine (US EPA) ou européenne (EFSA). Elles établissent un cadre pour la quantification et la caractérisation de l'exposition aux polluants environnementaux et l'évaluation du risque cancérigène, reproductif ou écologique.

La première étape dans l'évaluation du risque consiste à faire état de la situation sanitaire : identification des composés susceptibles d'entraîner des effets néfastes sur la santé et quantification de la présence de ces composés dans l'environnement. Les études de biosurveillance vont permettre de cartographier les polluants présents dans l'environnement, en tentant d'associer les résultats obtenus à des habitudes sanitaires ou de consommation. La recherche de marqueurs d'exposition dans les matrices biologiques va permettre de préciser les polluants auxquels la population est réellement exposée au niveau interne. La compréhension du devenir de la molécule dans l'organisme et la réalisation d'études de toxicité permettront d'évaluer le risque lié à l'exposition. Il s'agit alors de déterminer la dose provoquant un effet toxique (toxicodynamie). La relation dose-effet toxique peut être déterminée par la modélisation des résultats des études de toxicité. Au cours de cette étape, certaines valeurs seuils de toxicologie sont établies pour quantifier la toxicité et catégoriser la substance, comme par exemple la « benchmark dose », obtenue par la modélisation des données dose-réponse (AFSSET 2010). Une fois la toxicité intrinsèque du composé évaluée, la toxicité du composé dans des conditions réelles d'exposition doit être déterminée. Il s'agit alors de définir la quantité en composé à laquelle la population peut être couramment exposée dans l'environnement, selon la nature de l'exposition. Pour cela, il faut tenir compte des voies d'exposition, de l'importance, la durée et la fréquence de la dose à laquelle la population peut être exposée.

Au cours de l'évaluation du risque, la détermination du devenir du composé au sein de l'organisme, c'est-à-dire la caractérisation de sa toxicocinétique, en particulier dans les organes cibles, est importante. Les résultats de ces études, le plus souvent menées chez l'animal, sont souvent analysés par le biais de modèles comme les modèles pharmacocinétiques à fondement physiologique (PBPK pour Physiologically Based Pharmacokinetic). Ces modèles ont l'avantage d'être prédictifs pour de nombreuses situations d'exposition (dose, population). La modélisation PBPK tient compte des paramètres physiologiques de l'individu et des propriétés physico-chimiques de la molécule et permet d'estimer ses paramètres cinétiques (Reddy *et al.* 2013). Ces modèles permettent de comprendre l'évolution des concentrations en composé au sein de l'organisme. L'exposition interne réelle dans différentes situations d'exposition et populations peut être simulée. Les concentrations tissulaires seront éventuellement mises en relation avec un effet (toxique) et une dose réelle d'exposition externe.

La France est le plus grand consommateur européen de pesticides (62 700 tonnes en 2011) (UIPP 2012) et le troisième pays au niveau mondial derrière les Etats-Unis et le Japon. La forte exposition de la population et la toxicité recensée de certains insecticides soulignent la nécessité d'évaluer le risque associé. Les familles les plus concernées sont celles émergentes pour lesquelles peu de données existent (InVS 2013; Zhang *et al.* 2011).

Les insecticides regroupent plusieurs familles : les organochlorés et les organophosphorés qui ont été fortement utilisés, les carbamates, les pyréthriinoïdes et d'autres composés isolés (dérivés soufrés...). Les organochlorés (DDT, lindane), malgré une toxicité aiguë faible envers l'homme, sont des substances très stables et bioaccumulables dans l'environnement et chez l'homme. Les organophosphorés (parathion, chlorpyrifos) sont à l'inverse très toxiques envers l'homme et peu rémanents dans l'environnement. Les organochlorés et organophosphorés font partie des premières familles chimiques d'insecticides à avoir été développées et utilisées. Elles sont actuellement en régression. Des cas de toxicités envers la santé humaine et l'environnement ont été recensés suite à l'exposition à certains composés comme la chlordécone. Cet organochloré, utilisé dans la lutte contre le charançon du bananier dans les Antilles de 1973 à 1993, est rémanent dans les sols et les eaux. Il

est suspecté d'avoir provoqué l'augmentation du nombre de cancers de la prostate dans la population antillaise (Multigner *et al.* 2010). Suite à l'impact sanitaire reconnu pour ces deux familles chimiques, ont émergé les pyréthriinoïdes de synthèse dans les années 1970/80 basés sur la structure des pyrèthres naturels. Peu persistants dans l'environnement, ils présentent l'avantage d'être moins toxiques pour l'homme et de posséder une plus grande efficacité envers la cible. Cependant, la population est exposée conjointement à l'ensemble des molécules de ces familles chimiques. Les effets toxiques connus pour un composé pris individuellement peuvent être synergiques ou potentialisés en condition de mélange (Teuschler *et al.* 2002).

La description de la structure chimique, de l'exposition, de la toxicocinétique et des effets toxiques des pyréthriinoïdes permettra d'appréhender la place de cette famille chimique au quotidien et les risques associés. Par la suite, les étapes suivies pour la modélisation des données de cinétique seront décrites. Le développement d'une méthode analytique adéquat pour quantifier les substances d'intérêt sera expliqué, suivi des études de cinétique chez l'animal. Puis la modélisation des données de cinétique via l'élaboration des modèles PBPK sera abordée, en précisant leur place dans l'évaluation du risque. Enfin, les conditions *in vitro* optimales pour la génération de données dans le cas d'une extrapolation *in vitro-in vivo* (IVIVE) seront expliquées. La connaissance sur les pyréthriinoïdes dans chacun de ses domaines sera renseignée.

Etat de l'art

ETAT DE L'ART

I. Evaluation du risque lié à l'exposition aux pyréthrinoïdes

I.1. Caractéristiques chimiques

Les pyréthrinoïdes sont des insecticides de synthèse issus des pyréthrines, composés naturels présents dans les fleurs du pyrèthre ou du chrysanthème. Ils possèdent une structure chimique commune : une partie acide reliée à une partie alcool par une liaison ester (Figure 1). Possédant une activité spontanée envers le système nerveux des insectes, les pyréthrines naturelles restent instables dans l'environnement. Leur utilisation dans le milieu agricole en est alors limitée. Pour y remédier, de nombreuses modifications de la structure chimique des pyréthrines naturelles ont été réalisées au fil des années. L'objectif était d'augmenter leur photostabilité, tout en gardant une activité insecticide importante et une faible toxicité envers l'homme. L'évolution structurale des pyréthrinoïdes de synthèse est présentée dans la Figure 2 (Soderlund *et al.* 2002). La liaison insaturée sur la partie alcool a été remplacée par un cycle aromatique et des groupements halogénés (chlore et/ou fluor) sur la partie acide ont été introduits à la place des groupements méthyles. Ces modifications ont permis d'augmenter la stabilité du composé dans l'environnement (perméthrine, bifenthrine).

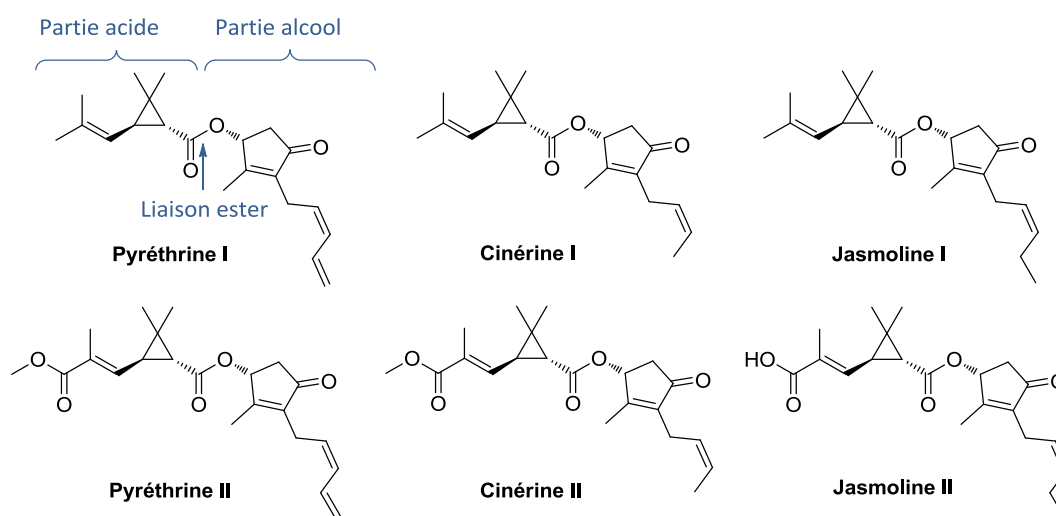


Figure 1. Représentation des six pyréthrines naturelles

Puis, la puissance insecticide a été accrue par l'instauration d'un groupement cyano en position 1 de la partie alcool, combinée à la modification successive de la nature des groupements halogénés (deltaméthrine, cyperméthrine, cyfluthrine...). Une première catégorisation des pyréthrinoïdes a alors été réalisée : les pyréthrinoïdes ne présentant pas de groupement cyano, comme la perméthrine, appartiennent aux pyréthrinoïdes de Type I. Le Type II désigne les pyréthrinoïdes possédant un groupement cyano comme la deltaméthrine (Lawrence and Casida 1982).

La plupart des pyréthrinoïdes de synthèse ont la particularité d'exister sous forme de mélange regroupant de 4 à 8 isomères, comme pour la cyperméthrine. Quelques pyréthrinoïdes comme l'alléthrine, la deltaméthrine ou la tralométhrine existent sous une seule configuration. La chiralité de la molécule vient le plus souvent du groupement acide. Ce groupement possède deux carbones asymétriques en position 1 et 3 du groupement cyclopropane.

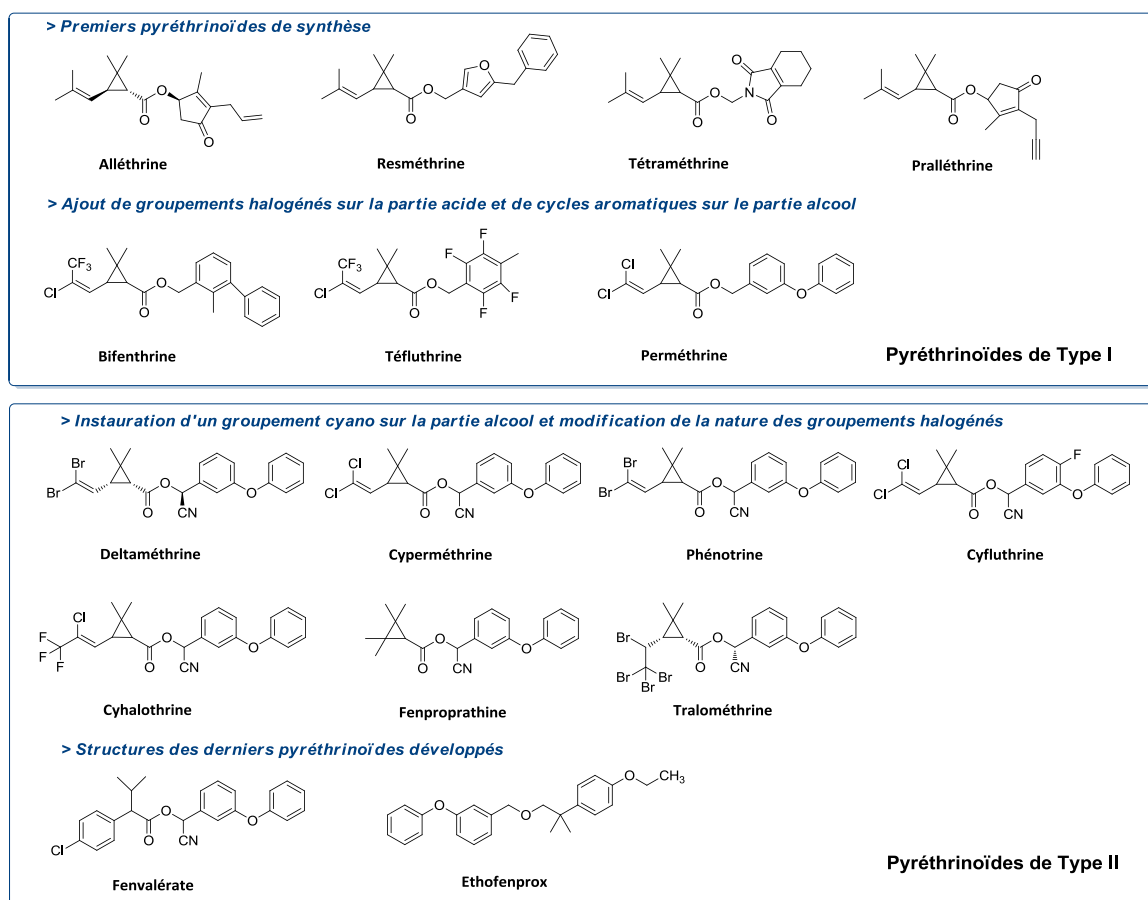


Figure 2. Evolution structurale des pyréthrinoïdes de synthèse

I.2. Une famille d'insecticides ubiquitaire à large utilisation

La famille des pyréthrinoïdes a vu sa consommation augmenter ces dernières années suite aux restrictions d'utilisation des organochlorés et des organophosphorés (UIPP 2012). Par conséquent, les pyréthrinoïdes ont été de plus en plus recherchés lors des études de caractérisation des classes chimiques présentes dans l'environnement (air ambiant, sols, alimentation). Ce type d'études permet ensuite d'orienter la recherche de ces composés dans les matrices biologiques pour évaluer une possible imprégnation de la population à ces insecticides.

I.1.a. Une famille d'insecticides à utilisations multiples

Les pyréthriinoïdes sont actuellement la famille d'insecticides la plus utilisée (InVS 2013). Leurs applications sont à la fois professionnelles et domestiques. Ils sont utilisés dans le milieu agricole (fruits et légumes, antiparasitaires pour animaux d'élevage), pour la protection des bois (arboriculture, scierie, traitement des meubles...), le traitement des immeubles publics (hôpitaux, bureaux) et des véhicules de transport (voiture, avion). Ils sont aussi présents dans les insecticides domestiques (logement, jardin, antiparasitaire pour animaux domestiques) et les antiparasitaires humains. Le logement reste à ce jour le lieu privilégié de l'utilisation de ces insecticides, à la hauteur de 89 % (Bouvier *et al.* 2005).

I.1.b. De nombreuses sources d'exposition

La population est exposée quotidiennement aux pyréthriinoïdes par différentes voies d'exposition (Figure 3)(ANSES 2010; Zartarian *et al.* 2012).

La voie orale demeure la principale source d'exposition, par l'alimentation principalement, lors de l'ingestion de produits traités directement (fruits, légumes) ou avant transformation (viande) (Sassine *et al.* 2004). Certains résidus de pyréthriinoïdes ont été en effet détectés dans les aliments tels que les fruits et les céréales (Dong *et al.* 2008; EFSA 2013; Jardim and Caldas 2014; Melnyk *et al.* 2014; Sannino *et al.* 2003; Schettgen *et al.* 2002a). Lors d'une étude menée dans l'Union Européenne, les résidus en cyperméthrine ont été mesurés au-dessus de la limite maximum de résidus autorisée dans les aliments (poireau). La cyperméthrine était le pyréthriinoïde le plus souvent détecté (salades, fraises, pêches). La perméthrine, second pyréthriinoïde recherché dans cette étude, n'a été retrouvée que dans la viande porcine, et uniquement à l'état de traces (EFSA 2013).

L'inhalation est une autre voie d'exposition. Les pyréthriinoïdes peuvent être présents sous forme de fines gouttelettes dans l'air intérieur des logements (sols, canapés) suite à l'utilisation d'aérosols ou de fumigènes (Berkowitz *et al.* 2003; Morgan 2012; Morgan *et al.* 2007). Ils sont aussi retrouvés dans l'air extérieur suite au traitement des cultures domestiques (Zhang *et al.* 1991) ou à l'épandage des cultures agricoles (Channa *et al.* 2012). Cependant, cette voie demeure minoritaire compte tenu de la faible volatilité des pyréthriinoïdes. En effet, la tension de vapeur, à 2 µPa à 20°C pour la perméthrine par exemple, se situe très en dessous de la limite qualifiant un composé de peu volatil (< 5 Pa).

Enfin, la population peut être exposée par la voie cutanée. L'exposition peut se produire par simple contact avec une surface traitée ou lors de l'application de crèmes, shampoings ou sprays dans le cas d'un traitement curatif ou préventif antiparasitaire (Tomalik-Scharte *et al.* 2005). La voie cutanée demeure néanmoins minoritaire car la pénétration des pyréthriinoïdes à travers la peau reste difficile (InVS 2013; US EPA 2007).

Ces voies d'exposition concernent la population générale, mais certaines sous-populations peuvent être plus exposées, selon leur âge ou leur profession. Les jeunes enfants demeurent les plus exposés aux pyréthriinoïdes. La voie orale est la source d'exposition privilégiée, pour plusieurs raisons. Des traces de pyréthriinoïdes ont été détectées dans l'alimentation pour enfants (Corcellas *et al.* 2012; Dobrinas *et al.* 2011; EFSA 2013). La présence fréquente des enfants sur le sol et leur contact avec les poussières où s'accumulent les pyréthriinoïdes (Starr *et al.* 2008), accompagnés du phénomène de

main à la bouche, accroissent l'exposition des enfants à ces composés. Certains professionnels sont plus largement exposés à ces insecticides comme les agriculteurs (Spencer and O'Malley 2006; Wang *et al.* 2007) ou le personnel travaillant dans les avions, lors de la désinsectisation de l'appareil (Wei *et al.* 2013).

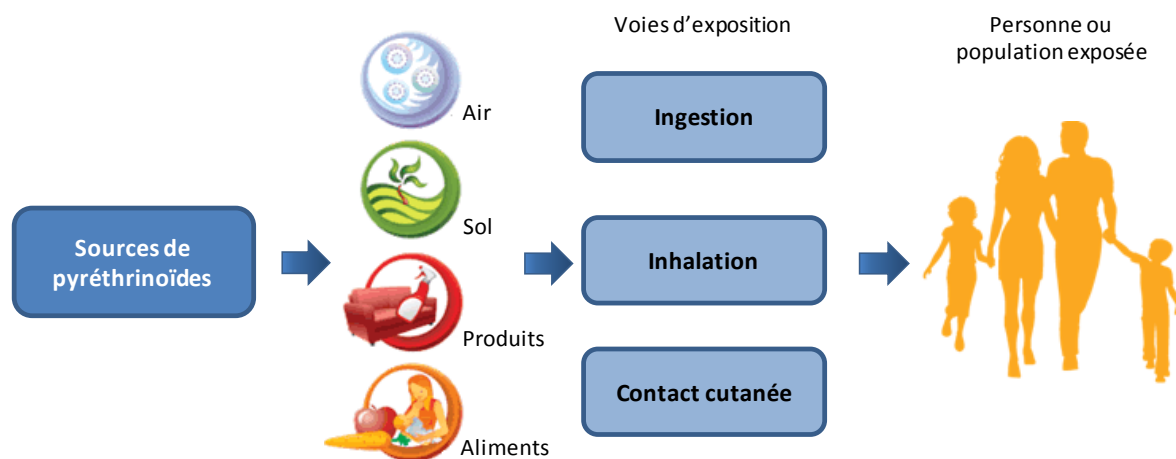


Figure 3. Présentation des différentes sources et voies d'exposition à la famille des pyréthrinoides (adapté de Santé Canada (2010))

I.1.c. Une population fortement exposée

La biosurveillance au sein de matrices biologiques consiste à rechercher et mesurer des biomarqueurs d'exposition aux polluants. Les composés recherchés, dépendant du profil cinétique du polluant, correspondent soit au composé parent, soit à son ou ses métabolites. Ces derniers sont souvent plus stables dans l'organisme. Les méthodes de prélèvements sont de préférence non invasives avec des natures d'échantillons diverses (urine, méconium, cheveux, sang du cordon ombilical, lait maternel) (Berton *et al.* 2014; Corcellas *et al.* 2012; Corrion *et al.* 2005; Leng *et al.* 2006). Les prélèvements sanguins sont donc peu privilégiés. Ces études sont réalisées sur un échantillon de la population d'un nombre assez important pour être représentatif de la catégorie étudiée. Le type de population choisi dépend de l'objectif de l'étude. Un échantillon de la population générale ou d'une sous-population choisie selon leur âge (enfant), leur état physiologique (femmes enceintes) ou leur habitat (urbain ou rural) peut être étudié. Ce type d'études de biosurveillance n'a cessé d'augmenter ces dernières années, détectant de plus en plus de polluants. Cependant, ces résultats sont à mettre en regard des avancées technologiques dans le domaine de la chimie analytique, permettant de détecter des concentrations en composés toujours plus basses. Les études de biosurveillance étant des études lourdes et longues, il est nécessaire d'intégrer la recherche d'un plus grand nombre de familles chimiques dans une étude afin d'être le plus exhaustif.

Compte tenu du profil cinétique des pyréthrinoides, les métabolites et les composés parents servent de biomarqueurs d'exposition respectivement dans les urines et le sang, et les fèces et les cheveux. L'imprégnation de la population reste le plus souvent évaluée par la quantification de métabolites des pyréthrinoides, essentiellement dans les urines. Les métabolites recherchés sont au nombre de cinq : l'acide 3-phénoxybenzoïque (**3-PBA**), les acides *cis*- et *trans*-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-diméthyl cyclopropane carboxylique (***cis*-DCCA** et ***trans*-DCCA**), l'acide 4-fluoro-3-phénoxybenzoïque (**F-PBA**), l'acide 3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-diméthyl cyclopropane carboxylique (**DBCA**).

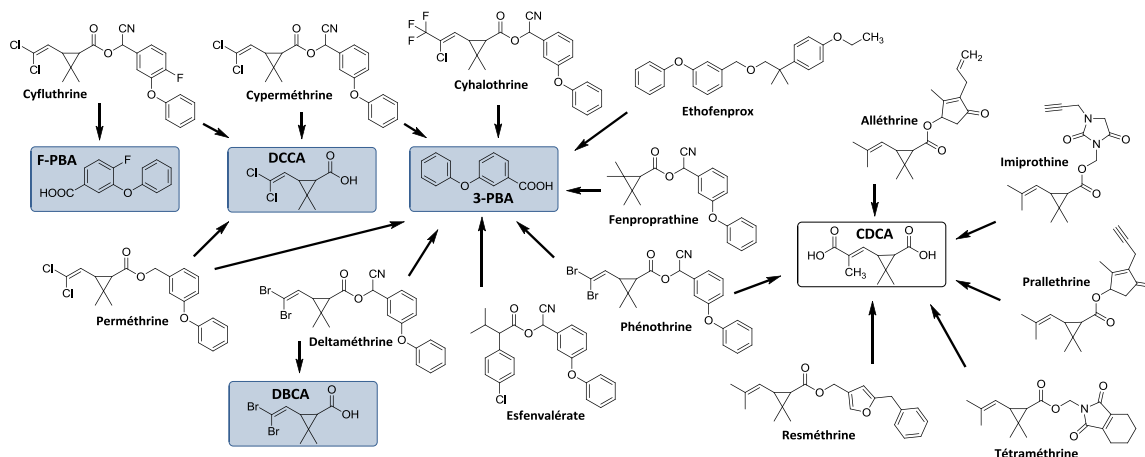


Figure 4. Pyréthriinoïdes et leurs métabolites associés. Les métabolites en bleu sont ceux recherchés lors des études de biosurveillance (adapté d'Ueyama *et al.* (2010b))

Ces métabolites étant parfois communs à plusieurs pyréthriinoïdes, en particulier le 3-PBA, les résultats des études de biosurveillance seront le reflet d'une exposition globale aux pyréthriinoïdes et non à un pyréthriinoïde spécifique (Figure 4) (InVS 2013; Ueyama *et al.* 2010b).

Une étude menée par l'Institut de Veille Sanitaire (InVS 2013) dans le cadre de l'étude nationale nutrition santé (ENNS) en 2006 a permis de montrer la présence des biomarqueurs d'exposition aux pyréthriinoïdes dans les urines d'un échantillon de la population française âgée de 18 à 74 ans et non exposée professionnellement (Figure 5). Commun à de nombreux pyréthriinoïdes, le 3-PBA est quantifié en grande quantité. La concentration en 3-PBA est deux fois plus forte que celles en *trans*-DCCA et en DBCA, elles-mêmes supérieures à celle en *cis*-DCCA. La médiane des concentrations en F-PBA était en dessous de la limite de quantification (0,1 µg/L). Ce métabolite n'est spécifique qu'à la cyfluthrine. Les valeurs des concentrations en DBCA sont similaires à celles en *trans*-DCCA. Le DBCA est spécifique d'une exposition à la deltaméthrine tandis que le *trans*-DCCA est un métabolite commun à la cyfluthrine, la cyperméthrine et la perméthrine.

La mise en perspective de ces résultats avec ceux obtenus dans d'autres pays permet de comparer le niveau d'exposition de la population française. Les habitudes alimentaires, agricoles et sanitaires pouvant néanmoins varier d'un pays à l'autre. Les résultats présentés dans le Tableau 1 correspondent à des études menées sur un échantillon important d'adultes non exposés volontairement aux pyréthriinoïdes, représentatif de la population du pays concerné.

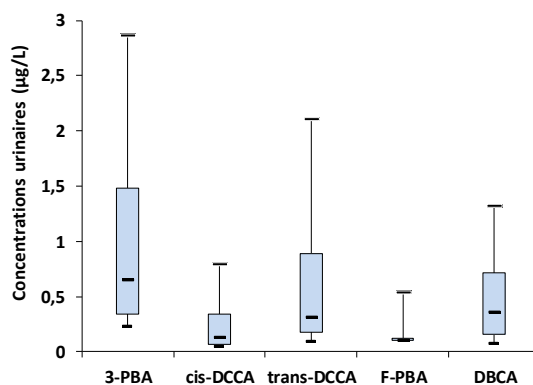


Figure 5. Distribution des concentrations en métabolites de pyréthriinoïdes dosés dans les urines d'un échantillon (n = 396) d'une population adulte (18-74 ans) considérée comme non exposée aux pyréthriinoïdes (InVS 2013)

Tableau 1. Valeur médiane (95^{ème} percentile) des concentrations urinaires (µg/L) en les métabolites 3-PBA, *cis*-DCCA, *trans*-DCCA, DBCA et F-PBA d'un échantillon de la population adulte française, allemande, canadienne, américaine et japonaise

	Références	Concentrations (µg/L)				
		3-PBA	<i>Cis</i> -DCCA	<i>Trans</i> -DCCA	DBCA	F-PBA
France (n = 396)	InVS (2013) Etude ENNS	0,65 (4,36)	0,13 (1,42)	0,31 (3,85)	0,36 (2,33)	< 0,03° (0,82)
Allemagne (n = 211)	Egerer <i>et al.</i> (2004)	0,04 (0,51)	< 0,03° (0,16)	< 0,03* (0,37)	< 0,02* (0,14)	< 0,02* (0,14)
Canada (n = 5431 à 5457)	Santé Canada (2010) Etude ECMS	0,23 (2,96)	0,07 (0,94)	0,17 (2,53)	< 0,006° (0,07)	< 0,008° (0,08)
Etats-Unis (n = 1128)	Barr <i>et al.</i> (2010) Etude NHANES	0,27 (3,25)	< 0,1° (0,96)	< 0,4° (2,56)	< 0,1° (< 0,1)	< 0,2° (< 0,2)
Japon (n = 448)	Ueyama <i>et al.</i> (2010b)	0,29 (1,96)	-	-	-	-

ENNS : étude nationale nutrition santé, **ECMS** : enquête canadienne sur la mesure de la santé, **NHANES** : étude nationale sur la santé et la nutrition, * : valeur de la limite de quantification, ° : valeur de la limite de détection

Dans chaque étude, les métabolites recherchés sont détectés, hormis pour le F-PBA. La France présente la plus forte concentration en 3-PBA, à un niveau deux à trois fois plus élevé que celui du Japon, des Etats-Unis et du Canada. Par ailleurs, toutes populations confondues, les concentrations en 3-PBA sont supérieures à celles en *trans*-DCCA, supérieures à celles en *cis*-DCCA, elles-mêmes supérieures à celles en DBCA et F-PBA. Une exception est à souligner pour la population française. Les concentrations en DBCA sont très importantes, alors que ce composé n'est pas détecté au sein des populations des autres pays. En Allemagne, deuxième pays européen consommateur de pesticides, la population semble être la moins exposée aux pyréthrinoïdes. La population française, avec les plus fortes concentrations en métabolites, en est la plus imprégnée. D'autres études de biosurveillance dosant les métabolites des pyréthrinoïdes dans les urines ont été réalisées dans la population adulte allemande (Heudorf and Angerer 2001; Heudorf *et al.* 2004; Heudorf *et al.* 2006; Leng *et al.* 2006), canadienne (Couture *et al.* 2009; Fortin *et al.* 2008a), américaine (Berkowitz *et al.* 2003; Lu *et al.* 2006; Trunnelle *et al.* 2014) et française (Le Grand *et al.* 2012). Les résultats obtenus concordent pour la plupart avec les données présentées dans le Tableau 1.

Concernant l'imprégnation des jeunes enfants, plus sensibles et supposés plus exposés aux pyréthrinoïdes, des études allemandes et américaines ont été menées sur des enfants âgés respectivement entre 3-14 ans et 6-11 ans. Leur niveau d'exposition était globalement plus important que celui de la population adulte. La concentration médiane en 3-PBA chez les enfants était en Allemagne de 0,43 µg/L, soit 10 fois plus importante que celle de la population adulte (FEA 2008) et aux Etats-Unis, de 0,33 µg/L, légèrement supérieure à celle chez l'adulte (Barr *et al.* 2010; Egeghy *et al.* 2011). Actuellement des études chez l'enfant sont en cours en France (projet ELFE, étude longitudinale française depuis l'enfance) mais aucun résultat n'a encore été publié sur les pyréthrinoïdes. Une étude menée aux Philippines a consisté à rechercher certains pyréthrinoïdes dans les cheveux d'enfants âgés de 2, 4 et 6 ans. La transfluthrine, la bioalléthrine étaient détectés chez l'enfant dès l'âge de 2 ans. Ces deux pyréthrinoïdes, la cyfluthrine et la cyperméthrine, étaient détectés en concentration importante chez l'enfant âgé de 4 ans, avec des moyennes respectives de 108 ng/g, 271 ng/g, 361 ng/g et 537 ng/g (Ostrea *et al.* 2014).

Récemment, l'exposition à un niveau plus précoce du développement (fœtus) a été évaluée (Berton *et al.* 2014; Ostrea *et al.* 2012). Le sang du cordon ombilical et le méconium, premières selles du nouveau-né, étaient alors prélevés et isolés. Dans l'étude menée sur des nouveaux nés picards, les composés parents (deltaméthrine, cyfluthrine et cyperméthrine) et le métabolite DCCA ont été recherchés. La deltaméthrine n'a pas été détecté, tandis que les valeurs moyennes pour la cyfluthrine et la cyperméthrine étaient respectivement de 424 ng/g et 188 ng/g. Le DCCA a été retrouvé à la concentration de 22 ng/g (Berton *et al.* 2014).

I.2. La toxicocinétique *in vivo* des pyréthrinoïdes

La toxicocinétique s'attache à décrire et comprendre le devenir de la molécule au sein de l'organisme. La molécule va être absorbée, atteindre la circulation sanguine, être distribuée au sein des organes et transformée en métabolites par des enzymes. La molécule parente et les métabolites sont ensuite excrétés via les fèces ou les urines. L'ensemble de ces étapes correspondent au processus d'absorption, distribution, métabolisme et excrétion (ADME) de la molécule. La toxicocinétique des pyréthrinoïdes a pu être caractérisée aux cours des études menées chez le rat sur deux composés: la deltaméthrine (Godin *et al.* 2010; Kim *et al.* 2008; Kim *et al.* 2010; Mirfazaelian *et al.* 2006; Tornero-Velez *et al.* 2010) et la perméthrine (Anadon *et al.* 1991; Elliott *et al.* 1973; Gaughan *et al.* 1977; Gray and Rickard 1982; Starr *et al.* 2014; Tornero-Velez *et al.* 2012). Le profil cinétique des pyréthrinoïdes en général sera présenté ci-dessous.

Suite à une exposition par voie orale, l'absorption des pyréthrinoïdes est faible chez le rat, avec une biodisponibilité entre 18-28 % (deltaméthrine) (Godin *et al.* 2010; Kim *et al.* 2008) et 61 % (perméthrine) (Anadon *et al.* 1991). L'absorption des pyréthrinoïdes est rapide, avec un pic de concentration dans le sang 1 à 2 h après l'administration. Une étude chez l'homme a permis de souligner la différence du niveau d'absorption entre la voie cutanée et orale pour la perméthrine (Woollen *et al.* 1992). A partir des concentrations urinaires en DCCA, l'absorption de la perméthrine est estimée à 1 % de la dose au niveau cutané, et de 35 à 60 % lors d'une ingestion orale.

Par leur caractère lipophile, les pyréthrinoïdes s'accumulent dans les organes, en particulier les graisses, la peau et les muscles (Gaughan *et al.* 1977; Kim *et al.* 2008). Le pic de concentration en pyréthrinoïde dans les graisses se situe 6 h à 12 h après l'ingestion. Pour les autres organes comme le cerveau, le foie et les reins, le profil cinétique des pyréthrinoïdes est similaire à celui observé dans le sang.

Les pyréthrinoïdes sont métabolisés au niveau de la muqueuse intestinale, du foie et du sang. Ce dernier site est une particularité du rat. Les carboxylestérases (CE), une des familles d'enzymes impliqués dans le métabolisme des pyréthrinoïdes, sont présents dans le sang uniquement au sein de cette espèce (Li *et al.* 2005; Satoh and Hosokawa 2010). La distribution du pyréthrinoïde dans les différentes phases du sang (globules rouges, plasma) a été étudiée sur la deltaméthrine. Celle-ci a été retrouvée très majoritairement dans le plasma (83 %) (Kim *et al.* 2008).

Le métabolisme des pyréthrinoïdes est rapide avec une demie vie inférieure à 2 h dans le sang et le foie (Starr *et al.*, 2012). Cependant, selon l'isomérisation de la molécule, le temps de résidence dans l'organisme peut varier. Pour la perméthrine, l'isomère *cis* est plus persistant que l'isomère *trans*, d'un facteur de 2 à 16 au niveau du sang et des tissus (Tornero-Velez *et al.* 2010).

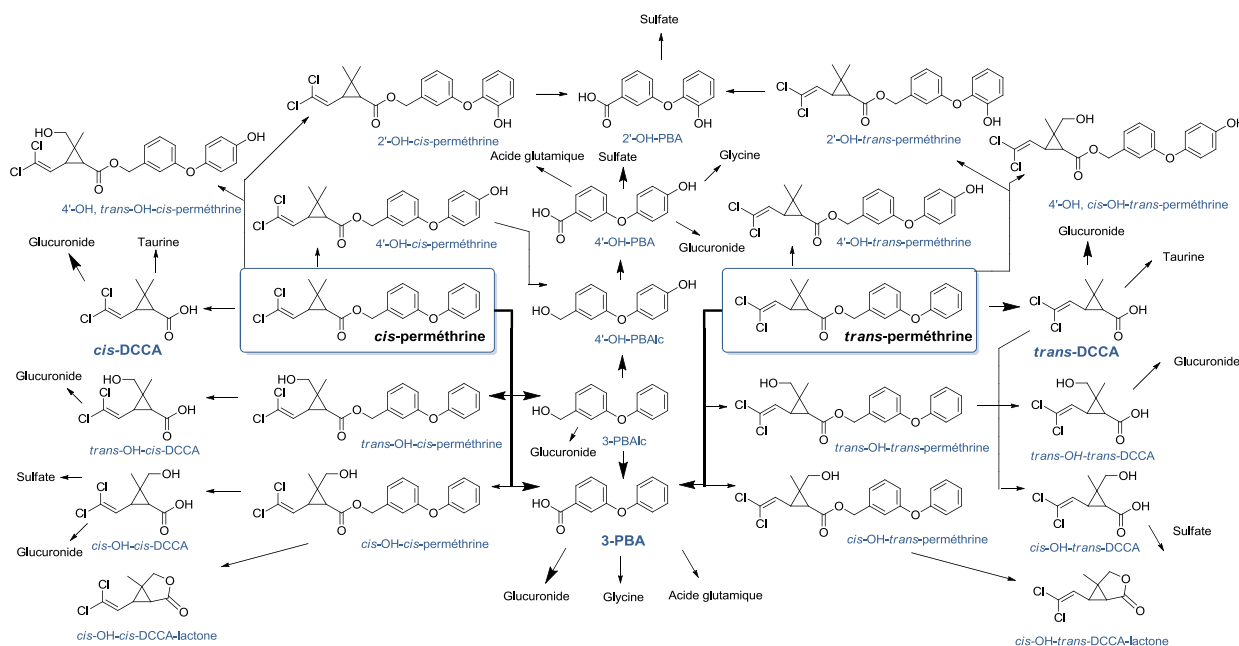


Figure 6. Représentation de l'ensemble des voies métaboliques empruntées par la *cis*- et *trans*-perméthrine chez les mammifères (Gaughan *et al.* 1977)

Les pyréthrinoïdes vont être détoxifiés par hydrolyse et oxydation entraînant la formation de nombreux métabolites inactifs, dont ceux recherchés couramment dans les campagnes de biosurveillance. Ceux-ci peuvent rester sous forme libre ou être conjugués à des groupements sulfate ou glucuronide (Elliott *et al.* 1973; Gaughan *et al.* 1977).

L'étude menée sur des isomères de la perméthrine par Gaughan *et al.* (1977) a permis de comprendre le devenir des pyréthrinoïdes chez les mammifères (Figure 6). L'étude a consisté à suivre l'évolution des isomères de la perméthrine chez le rat exposé oralement. Le radiomarquage sur la partie acide ou sur la partie alcool de la molécule a permis d'étudier la formation des métabolites. La radioactivité dans les organes, ainsi que dans les sites d'excrétion (urine et fèces), a été quantifiée après 24 h, puis au 12^{ème} jour après l'exposition. Après 24 h, la moitié de la radioactivité était retrouvée sur les sites d'excrétion. La moitié des composés parents et des métabolites était donc éliminée au bout d'une journée. Après 12 jours, la radioactivité était plus intense dans les urines suite à l'absorption de *trans*-perméthrine. Pour l'isomère *cis*, elle était aussi intense dans les urines que dans les fèces (Tableau 2). Les sites d'élimination des composés parents et des métabolites dépendent ainsi de l'isomérisation de la molécule.

Une étude plus approfondie a été réalisée sur la radioactivité retrouvée à 24 h sur les sites d'excrétion, pour discriminer les composés parents des métabolites (Tableau 3). Les dérivés de l'isomère *cis* sont les seuls composés parents à avoir été retrouvés dans les fèces. Les formes majoritaires étaient la *cis*-perméthrine non oxydée et la 4'-OH, *trans*-OH-perméthrine (4'-OH, *trans*-OH-per). Quel que soit l'isomère, le DCCA était majoritairement présent dans les urines (forme glucuronidée essentiellement) avec une faible présence dans les fèces. Les formes libres et conjuguées de l'acide 4'-OH-phénoxybenzoïque-sulfate (4'-OH-PBA-sulfate) et du 3-PBA ont été retrouvées uniquement dans les urines, dans un rapport 2 : 1. La proportion de métabolites DCCA et 3-PBA de la *trans*-perméthrine par rapport à ceux de la *cis*-perméthrine était respectivement 3 fois et 1,5 fois plus importante.

Tableau 2. Pourcentage de radioactivité retrouvé dans les urines et les fèces après l'administration des formes séparées (1RS) *trans*-perméthrine et (1RS) *cis*-perméthrine chez le rat (Gaughan *et al.* 1977)

	Radiomarquage de la partie acide		Radiomarquage de la partie alcool	
	<i>Trans</i> -perméthrine	<i>Cis</i> -perméthrine	<i>Trans</i> -perméthrine	<i>Cis</i> -perméthrine
Urine				
0 - 1 ^{er} jour	57	34	74	44
1 ^{er} - 12 ^{ème} jour	25	20	5	8
Fèces				
0 - 1 ^{er} jour	9	27	12	26
1 ^{er} - 12 ^{ème} jour	5	15	2	18
Total (0 - 12 ^{ème} jour)	96	96	93	96

Tableau 3. Pourcentage de radioactivité dans les urines et les fèces à 24 h en composés parents et métabolites après l'administration orale des formes séparées (1RS) *trans*-perméthrine et (1RS) *cis*-perméthrine chez le rat (Gaughan *et al.* 1977)

	Radiomarquage de la partie acide				Radiomarquage de la partie alcool			
	<i>Trans</i> -perméthrine		<i>Cis</i> -perméthrine		<i>Trans</i> -perméthrine		<i>Cis</i> -perméthrine	
	Urine	Fèces	Urine	Fèces	Urine	Fèces	Urine	Fèces
Perméthrine	0	2,8	0	6,7	0	5,3	0	7,3
2'-OH-per	0	0	0	0,5	0	0	0	0,9
4'-OH-per	0	0	0	2,7	0	0	0	2,4
4'-OH, <i>trans</i> -OH-per	0	0	0	3,9	0	0	0	3,8
DCCA	47,5	2,7	14,5	0,5	-	-	-	-
OH-DCCA	2,7	1,6	11,8	3,8	-	-	-	-
3-PBA	-	-	-	-	29,3	1,5	10,1	0
2'-OH-PBA-sulfate	-	-	-	-	0	0	2,9	0
4'-OH-PBA-sulfate	-	-	-	-	42,8	0	29,3	0
Total	50,2	7,1	26,3	18,1	72,1	6,8	42,3	14,4

Chez l'homme, des rapports différents entre les concentrations urinaires en métabolites ont été observés selon la voie d'exposition. Suite à une exposition orale à la cyperméthrine, la proportion de concentration en DCCA par rapport à la somme des concentrations en 3-PBA et 4'-OH-PBA est identique. Suite à une exposition cutanée, les concentrations en formes phénoxy sont supérieures à celles en DCCA (Woollen *et al.* 1992). Pour la perméthrine, le ratio (1 : 1,2) entre les concentrations urinaires des formes *trans*- et *cis*-DCCA indique une exposition cutanée et le rapport (2 : 1) une exposition orale (Eadsforth and Baldwin 1983). Chez l'homme, l'élimination du DCCA s'effectue majoritairement dans les 24 premières heures et est complète au bout de 168 h. La quantité de 4'-OH-PBA formée est moins importante chez l'homme que chez le rat.

Ces études sur les pyréthriinoïdes ont permis d'évaluer d'autres points de cinétique. Aux doses étudiées, la distribution des pyréthriinoïdes a été qualifiée de dose-dépendante contrairement à la vitesse d'élimination (Kim *et al.* 2008). La cinétique de la deltaméthrine étudiée à différents stades

de développement du rat confirme une activité métabolique plus faible chez le jeune rat (Kim *et al.* 2010).

Les pyréthriinoïdes et leurs métabolites ont le plus souvent été étudiés séparément (Ueyama *et al.* 2010a), hormis les études d'Anadon (1991) et de Gaughan (1977) dont l'objectif était de comprendre le métabolisme de la perméthrine. L'étude d'Ueyama *et al.* (2010a) a consisté à injecter par voie intraveineuse du 3-PBA chez le rat. L'élimination du composé au niveau du sang s'est avérée biphasique, avec respectivement une demi-vie de 0,01 h et 1,5 h. Récemment, la cinétique des pyréthriinoïdes et de leurs métabolites couramment dosés dans les études de biosurveillance (3-PBA et le *cis* et *trans*-DCCA) a été caractérisée dans le sang et le cerveau chez le rat (Starr *et al.* 2014). Les métabolites possédant un groupe cyclopropane (DCCA par exemple) sont plus persistants dans le cerveau et dans le sang que ceux présentant un groupe phénoxy (3-PBA). Les métabolites dérivés du 3-PBA ont cependant une demi-vie plus grande que les composés parents. L'hypothèse d'une diffusion des métabolites dans le cerveau a été avancée puisque les concentrations en métabolites étaient supérieures à celles des parents dans le cerveau, mais inférieures dans le sang.

I.3. Des effets toxiques neuronaux et hormonaux recensés

I.3.a. Un mécanisme d'action basé sur la modification de la transmission nerveuse chez l'insecte

Les pyréthriinoïdes agissent sur la transmission de l'influx nerveux chez l'insecte, au niveau des canaux sodium voltage dépendant (Figure 7). Lors de la transmission du message nerveux en condition basale, les canaux sodium permettent de dépolariser la membrane des cellules (neurones), habituellement maintenue un potentiel d'action de -70 mV. La dépolarisation de la membrane va permettre l'ouverture des canaux sodium (état « ouvert ») et l'entrée d'ions dans la cellule. Les canaux passent ensuite à l'état « inactivé » (impermeables aux ions mais encore activables) et « inactivé-fermé » (impermeables aux ions et inactivables) pour enfin atteindre un état de « repos-fermé ». Cette dernière étape est essentielle pour limiter les flux d'ions et la durée de la dépolarisation avant la réouverture.

Lors d'une exposition aux pyréthriinoïdes, pendant la phase de dépolarisation, la membrane va s'hyperpolariser par rapport à la situation physiologique. Le temps d'ouverture des canaux va être augmenté, ainsi que le passage d'ions (Ray and Forshaw 2000; Shafer *et al.* 2005). Les pyréthriinoïdes de Type I vont provoquer la génération de plusieurs potentiels d'action identiques lors d'une seule dépolarisation. Les pyréthriinoïdes de Type II vont entraîner une dépolarisation encore plus forte de la membrane que celle obtenue avec les pyréthriinoïdes de Type I. Plusieurs potentiels d'action à amplitudes différentes seront cette fois-ci générés. Ces modifications provoquent au niveau physiologique une hyperexcitabilité.

Les canaux sodium sont les plus impliqués dans l'apparition des signes de toxicité, mais récemment la participation d'autres réseaux (glutamatergique, très abondant au niveau du système nerveux) a aussi été identifiée (Shafer *et al.* 2008; Soderlund *et al.* 2002).

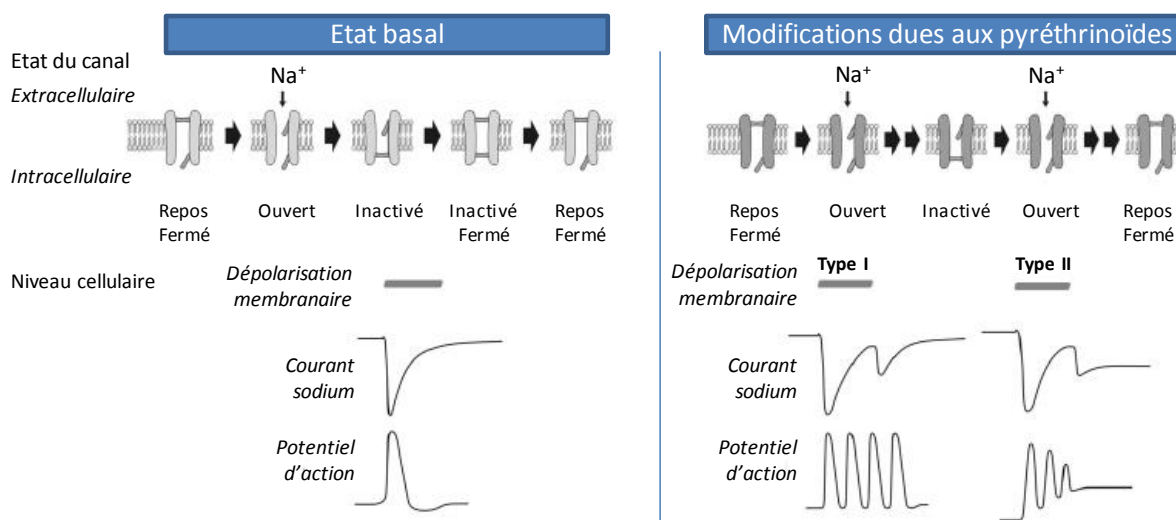


Figure 7. Modification de la polarisation de la membrane et de la génération du potentiel d'action à l'état basal et suite à une exposition aux pyréthrinoïdes (adapté de Shafer *et al.*(2005))

I.3.b. Des effets toxiques recensés chez les mammifères

La présence des signes de toxicité chez les mammifères est directement corrélée à la dose et la voie d'exposition. Les valeurs des concentrations en composé provoquant la mort de 50 % d'une population d'étude (DL50) peuvent varier selon la nature du solvant (aqueux ou lipophile) utilisé pour dissoudre la molécule. Chez le rat, la DL50 de la deltaméthrine passe de 95 mg/kg à plus de 5 000 mg/kg selon que la molécule soit dissoute dans de l'huile de maïs ou dans de l'eau (Soderlund *et al.* 2002). L'apparition des signes de toxicité dépend aussi du temps de présence du pyréthrinoïde dans l'organisme. La vitesse de transformation des pyréthrinoïdes dépendra de l'activité des enzymes impliquées dans leur métabolisme et de leur structure chimique. Par exemple, un pyréthrinoïde restera plus longtemps dans l'organisme d'un jeune animal, où l'activité enzymatique n'est pas encore mature (Cantalamesa 1993; Kim *et al.* 2010). Les pyréthrinoïdes présentant la configuration (1*R*)-*cis* plutôt que (1*R*)-*trans* ou le carbone portant le groupement alpha cyano en configuration (*R*) au lieu de (*S*) seront plus stables, entraînant une plus forte toxicité (Lawrence and Casida 1982). Enfin, l'exposition aux pyréthrinoïdes conjointe à d'autres composés peut diminuer leur vitesse de métabolisation. C'est le cas des organophosphorés, inhibiteurs d'estérases, famille d'enzymes impliquées dans le métabolisme des pyréthrinoïdes (He *et al.* 1989). L'ensemble des études de toxicité menées sur les pyréthrinoïdes est décrit par Bradberry *et al.* (2005), Burns *et al.* (2013), Gray et Soderlund (1985) et Miyamoto (1976).

Tableau 4. Toxicité aiguë intracérébrale (DL 50) en différents pyréthrinoïdes chez la souris

Pyréthrinoïdes	Groupement halogénés	Isomères	Groupement cyano	DL 50 (µg/g cerveau)
Perméthrine	Cl	<i>trans</i>	Non	> 860
Perméthrine	Cl	<i>cis</i>	Non	11
Cyperméthrine	Cl	<i>trans</i>	Oui (S)	1,6
Cyperméthrine	Cl	<i>cis</i>	Oui (S)	0,6
Deltaméthrine	Br	<i>cis</i>	Oui (S)	0,5

1.3.b.i. Toxicité neuronale

Par leur mécanisme d'action, les pyréthrinoïdes provoquent à fortes doses des effets toxiques sur le système nerveux central. L'évaluation de la toxicité neuronale se base sur les aspects comportementaux de l'animal comme l'activité motrice, la coordination des gestes, la réponse neuromusculaire, les tremblements mais aussi sur les sens comme la sensibilité acoustique, l'apprentissage, la mémoire, les réponses sensorielles.... (Wolansky and Harrill 2008). Dans les cas d'une exposition aiguë, ces paramètres seront évalués avant le traitement, au temps où l'effet est maximal, puis 7 et 14 jours après l'exposition (Soderlund *et al.* 2002).

Chez l'animal, deux types de syndrome, avec un mécanisme d'action différent, peuvent apparaître suite à une forte exposition aux pyréthrinoïdes. La description du syndrome T (Tremblements) et du syndrome CS (Choréoathétose) se base sur le comportement du mammifère suite à une exposition (Tableau 5). Leur nature et leur importance dépendent du pyréthrinoïde et de la dose à laquelle l'animal est exposé (Breckenridge *et al.* 2009; Verschoyle and Aldridge 1980). L'association de cette classification basée sur le type d'effets toxiques provoqués (Verschoyle and Aldridge 1980) à celle établie selon la structure chimique des pyréthrinoïdes (Lawrence and Casida 1982) permet d'établir une classification générale : la survenue du syndrome T fait suite à une exposition aux pyréthrinoïdes de Type I (sans groupement cyano) et le syndrome CS à une exposition à ceux de Type II (avec un groupement cyano). Cette classification peut comporter cependant quelques exceptions. L'ensemble des études de neurotoxicité est détaillé par Wolansky *et al.* (2008).

L'expression de la toxicité neuronale a toujours été étudiée dans le cas d'une exposition à un seul pyréthrinoïde. Une étude récente a consisté à exposer des rats mâles à un mélange de pyréthrinoïdes, se voulant représentatif d'une exposition chez l'homme (Starr *et al.* 2012). Deux doses ont été réalisées : 11,2 mg/kg et 27,4 mg/kg. Cette dernière contenait 7,9 mg/kg de cyperméthrine, 0,9 mg/kg de deltaméthrine, 0,7 mg/kg d'esfenvalérate, 5,7 mg/kg de *cis*-perméthrine, 8,6 mg/kg de *trans*-perméthrine et 3,5 mg/kg de β -cyfluthrine.

Tableau 5. Classification simplifiée des pyréthrinoïdes selon leur structure et les effets toxiques provoqués chez l'animal

	Signes	Pyréthrinoïdes
Syndrome T (Tremblements)	Agressivité Augmentation de la sensibilité aux stimuli Tremblements légers Prostration Hyperthermie	Type I (sans groupement cyano)
Syndrome CS (Choréoathétose)	Coup de patte Action de creuser Salivation abondante Mouvements Involontaires non coordonnés brusques réguliers Attaque clonique Hypothermie	Type II (groupement cyano)

A ces deux doses, les signes de toxicité étaient modérés : alternance de repos et de mouvements non locomoteurs (grattements) et légère secousse du corps. Aucun signe de toxicité caractéristique d'une forte exposition aux pyréthrinoïdes comme l'hypersalivation et le tremblement du corps entier n'a été observé. Une diminution de l'activité motrice de l'animal exposé par rapport au groupe contrôle a été observée, expliquée par l'additivité des doses. Une relation dose-réponse linéaire a été établie entre les concentrations en pyréthrinoïdes dans le cerveau et les activités motrices.

Chez l'homme, les signes d'intoxication aux pyréthrinoïdes ont été recensés lors d'expositions professionnelles (vaporisation des cultures ou utilisation au laboratoire), accidentelles ou volontaires (suicide). Les signes diffèrent selon la voie d'exposition. Des sensations anormales au visage (picotements, brûlures) apparaissent 30 min à 3 h après une exposition cutanée professionnelle ou accidentelle à certains pyréthrinoïdes (cyperméthrine, perméthrine, fenvalerate ou fenpropathrine). Ces signes disparaissent dans un délai maximum d'un jour. Même si elle est imprécise, la dose d'exposition demeure faible. En effet, l'exposition cutanée est due le plus souvent à des projections, reçues par exemple lors du nettoyage de cuves contenant des solutions à base de pyréthrinoïdes (He *et al.* 1989; Lequesne *et al.* 1981). Lors de suicides, les signes de toxicité observés étaient similaires lors d'une ingestion à très forte dose de deltaméthrine (5 à 500 mL d'une émulsion à 2,5 %), fenvalerate (10 à 500 mL d'une émulsion à 20 %) ou cyperméthrine (10 à 70 mL d'une émulsion à 10 %). Ils correspondaient à des vertiges, maux de têtes et problèmes digestifs (nausée, vomissement). Paresthésie, palpitation, oppression thoracique étaient plus rares (He *et al.* 1989). Dans des cas de suicide par ingestion de perméthrine (600 mL d'une émulsion à 20 %), les signes de toxicité au niveau du tractus gastro-intestinal étaient similaires. Certaines perturbations au niveau du système nerveux central (coma, convulsions) ont été aussi recensées (Gotoh *et al.* 1998; Yang *et al.* 2002).

1.3.b.ii. Perturbation hormonale

Aux différents stades de développement (murant et adulte), des effets sur la reproduction chez le rat et la souris mâle ont été observés suite à une exposition chronique par voie orale aux pyréthrinoïdes (cyperméthrine/perméthrine) (Tableau 6). De manière générale, aux plus fortes concentrations d'exposition, ont été recensées une modification histologique des testicules, une diminution dans le sérum de la concentration en testostérone et en hormone lutéinisante (LH) (impliquée dans la synthèse de la testostérone) ainsi qu'une décroissance de la production journalière de spermatozoïdes (Elbetieha *et al.* 2001; Jin *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2008). Des perturbations de l'expression de certains gènes reliés à la synthèse de la testostérone ont été aussi observées. Dans des expériences d'accouplement, il a été conclu à une diminution de la fertilité chez les mâles exposés à la plus forte dose en cyperméthrine. Cela fait suite à l'observation d'une diminution du nombre d'implantations chez les femelles et du nombre de fœtus viables (Elbetieha *et al.* 2001). Par ailleurs, une étude a consisté à faire ingérer à des nouveau-nés mâles de la cyperméthrine via le lait maternel des femelles souris exposées. Une diminution du poids des testicules, une décroissance des couches de cellules impliquées dans la spermatogénèse et une augmentation du diamètre des tubes séminifères ont été observées. Si certaines modifications disparaissent une fois l'âge adulte atteint, la diminution du nombre de spermatozoïdes et du poids des testicules reste irréversible (Wang *et al.* 2011). Les études menées sur les différents isomères de la perméthrine ont confirmées que le niveau de toxicité était dépendant de la configuration de la

molécule. En effet les modifications hormonales n'apparaissent qu'à la suite d'une exposition à la *cis*-perméthrine (Jin *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2008).

Chez l'homme, certaines perturbations physiologiques, souvent liées à la reproduction, ont été associées à la présence de métabolites des pyréthrinoïdes dans les urines. L'attribution de ces signes de toxicité à une imprégnation aux pyréthrinoïdes doit cependant être faite avec précaution. La population est en effet exposée simultanément à une multitude de polluants. Les résultats observés chez l'homme corroborent les observations faites chez l'animal mâle lors d'une exposition chronique : modification de la qualité du sperme, aneuploïdie des spermatozoïdes, diminution de leur nombre, de leur motilité et modification de leur ADN (Imai *et al.* 2014; Meeker *et al.* 2008; Young *et al.* 2013). Une modification des taux en LH et en hormones thyroïdiennes T3, T4 et thyrostimuline a aussi été diagnostiquée (Han *et al.* 2008; Meeker *et al.* 2006, 2009).

Tableau 6. Etudes menées sur la souris et le rat pour évaluer la toxicité sur la reproduction suite à une exposition aux pyréthrinoïdes

Etudes	Molécules	Espèces	Âges	Dose (par jour)	Temps d'exposition
Elbetieha <i>et al.</i> (2001)	Cyperméthrine	Rat mâle	80-90 jours	13,15 mg 18,93 mg 39,66 mg	12 semaines
Jin <i>et al.</i> (2012)	4 isomères séparés de la perméthrine	Souris mâle	3 semaines	0 mg/kg 25 mg/kg 50 mg/kg 75 mg/kg 100 mg/kg	3 semaines
Wang <i>et al.</i> (2011)	Cyperméthrine	Souris : - Femelles allaitantes - Nouveau-nés mâles	Femelles exposées allaitant leurs nouveau-nés	25 mg/kg	21 jours
Zhang <i>et al.</i> (2007)	<i>Cis</i> - Perméthrine	Souris mâle	8 semaines	0 mg/kg 35 mg/kg 70 mg/kg	6 semaines
Zhang <i>et al.</i> (2008)	<i>Cis</i> -perméthrine <i>Trans</i> -perméthrine	Souris mâle	8 semaines	70 mg/kg	6 semaines

1.3.b.iii. Autres signes de toxicité

Des modifications histologiques et métabonomiques hépatiques et rénales ont été notées, pouvant être considérées comme de nouveaux marqueurs d'exposition aux pyréthrinoïdes (Bhushan *et al.* 2013; Liang *et al.* 2013). L'étude a consisté à exposer des rats quotidiennement pendant 60 jours à la perméthrine ou à la deltaméthrine à la dose orale respective de 12 et 75 mg/kg/j et 1,02 et 6,4 mg/kg/j. Des modifications au niveau urinaire et sérologique de certains composés organiques et sels confirmaient la présence de lésions rénales et hépatiques. Aucun effet carcinogène au niveau chronique n'a été recensé (Ishmael and Litchfield 1988).

I.4. Place de la perméthrine parmi les pyréthriinoïdes

Les études de biosurveillance, de cinétique et de toxicité sur les pyréthriinoïdes associées à la compréhension de leur structure chimique ont permis de souligner les caractéristiques de certains pyréthriinoïdes, dont la deltaméthrine, la perméthrine et la cyperméthrine.

La deltaméthrine est un composé fortement toxique, avec une DL 50 de 95 mg/kg par voie orale chez le rat mâle. A contrario la perméthrine et la cyperméthrine ont dans les mêmes conditions expérimentales une DL 50 respective de 1 200 et 297 mg/kg (Soderlund *et al.* 2002).

Au niveau structural, la deltaméthrine présente l'avantage de ne posséder qu'une seule configuration chimique, rendant la caractérisation de sa cinétique plus aisée. C'est sans doute la raison pour laquelle le nombre et le contenu des études sur la deltaméthrine sont plus importants et plus poussés que pour les autres pyréthriinoïdes. Les autres pyréthriinoïdes présentent plusieurs configurations chimiques, de quatre isomères pour la perméthrine jusqu'à huit isomères pour la cyperméthrine. Les isomères d'un même composé peuvent être étudiés en mélange mais l'interprétation des données, en particulier au niveau des effets, sera plus difficile. Ils peuvent aussi être étudiés de manière individuelle ce qui alourdira d'autant le plan expérimental.

Les résultats des études de quantification des polluants dans l'environnement ont montré une forte présence de cyperméthrine ou encore de perméthrine et non de deltaméthrine. Les pyréthriinoïdes sont les insecticides le plus souvent utilisés dans le traitement des logements et la perméthrine y est le plus souvent retrouvée. Cette molécule est aussi présente dans les produits pour le traitement des jardins (Stout *et al.* 2009).

Même si la toxicité aiguë de la cyperméthrine et la perméthrine s'avère plus faible que celle de la deltaméthrine, les effets dus à une exposition quotidienne peuvent être préoccupants. A partir de l'ensemble de ces données, la perméthrine semble un bon compromis entre une toxicité suspectée et des plans d'expériences faisables au vu du nombre de ses isomères. Il existe quatre stéréoisomères de la perméthrine : deux isomères présentant la configuration *cis* (1R/1S ; 3R/3S) et deux autres présentant la configuration *trans* (1R/1S ; 3S/3R) (Figure 8). La perméthrine est plus souvent décrite et étudiée sous ses configurations *cis* et *trans*, les quatre stéréoisomères de la perméthrine étant rarement différenciés. La perméthrine est un pyréthriinoïde de Type I, provoquant une augmentation de la sensibilité aux stimuli (Syndrome T), une salivation excessive, des crises cloniques et un mouvement anormal des membres supérieurs (Syndrome CS).

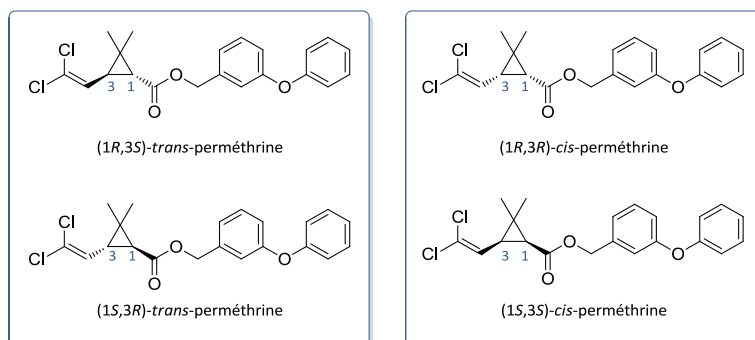


Figure 8. Les quatre stéréoisomères de la perméthrine

II. Génération et modélisation de données de cinétique *in vivo*

La modélisation des données de cinétique via les modèles PBPK permet d'approfondir la compréhension de la cinétique de la molécule. La qualité de la valeur des paramètres estimés lors de la modélisation va dépendre en partie de la qualité des données générées. Une attention particulière envers le plan d'expériences et le traitement des données doit être faite.

II.1. Démarche du développement d'une méthode analytique

La quantification des composés recherchés dans les matrices étudiées est le socle de toute étude de cinétique. La qualité des données générées dépend en grande partie des performances de la méthode analytique mise au point. Le développement de la méthode analytique peut se décomposer en deux parties : la mise au point et l'évaluation de la méthode.

II.1.a. Mise au point d'une méthode analytique

Le choix des techniques d'analyse utilisées dépend des propriétés physico-chimiques des molécules recherchées (polarité, volatilité, solubilité). Dans le domaine de la bioanalyse, il est couramment fait appel à deux procédés physiques complémentaires: la chromatographie et la spectrométrie.

L'appareil de chromatographie (chromatogramme) permet la séparation des différents composés présents dans un même échantillon. L'échantillon est entraîné par une phase mobile (liquide ou gaz) au contact d'une phase stationnaire (silice, papier, silice greffé). Chaque composé présent migre à une vitesse dépendant de ses caractéristiques chimiques et des phases mobiles et stationnaires employées. En fonction des applications, la chromatographie en phase gazeuse (GC), en phase liquide sur couche mince, en phase supercritique ou encore en phase liquide à haute performance (HPLC) peut être utilisée. Dans le cadre de la quantification des analytes, la GC et la HPLC couplées à une colonne sont les méthodes chromatographiques le plus souvent retenues. Les colonnes en chromatographie correspondent à un tube étroit à l'intérieur duquel est greffée une phase stationnaire et à travers lequel la phase mobile va progresser. Le choix de la nature de la phase stationnaire (polaire ou apolaire) va dépendre de la polarité des molécules à éluer.

La spectrométrie va permettre, une fois l'élution terminée, de qualifier et de quantifier précisément les analytes. Le choix du spectromètre dépend du paramètre physique mesuré (longueur d'onde ou masse des molécules).

Actuellement, la GC et la HPLC sont les deux types chromatographiques les plus couramment utilisés et sont très souvent couplées à un spectromètre de masse (Figure 9).

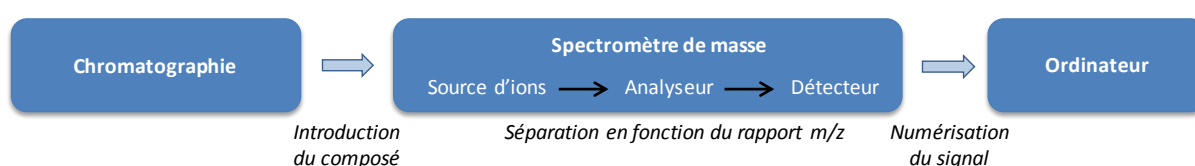


Figure 9. Schéma général de l'analyse d'un composé par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse

La chromatographie gazeuse fonctionne de la manière suivante. Le mélange à analyser est poussé à l'entrée de la colonne et transporté à travers elle par un gaz vecteur neutre (hélium, hydrogène, azote ou argon) sous un gradient de températures. La séparation des composés va se faire selon leur tension de vapeur et leur affinité pour la phase stationnaire présente à l'intérieur de la colonne.

Dans le cas de la HPLC, l'échantillon à analyser est poussé par un liquide avec un débit d'écoulement élevé, entraînant une augmentation de la pression dans le système. Cette technique permet de réduire le temps nécessaire à la séparation des composés présents dans l'échantillon. La fine granulométrie de la phase stationnaire permet d'améliorer la qualité de la séparation des molécules car la surface d'échange est augmentée. La pureté de l'échantillon est alors accrue. Les phases mobiles peuvent être composées d'un mélange miscible d'eau et de solvants organiques dont les plus communs sont le méthanol et l'acétonitrile. Des gradients de solvants peuvent être réalisés au cours de l'analyse. Le changement de la polarité de la phase mobile participe alors à la séparation des composés, selon leur caractère hydrophobe par exemple.

Par la suite, le spectromètre de masse permet de détecter et quantifier les molécules d'intérêt en fonction de leur masse et de caractériser leur structure chimique. Il réside sur le principe d'ionisation de la molécule, réalisée par ionisation chimique ou par impact électronique (GC). Dans ce dernier cas, une fois sorties de la colonne de chromatographie, les molécules vont arriver au niveau de la source du spectromètre de masse, émettrice d'électrons. Ces électrons vont ioniser les molécules, en leur arrachant un électron selon l'énergie produite. Ces molécules ionisées seront sélectionnées selon la valeur masse/charge (m/z) choisie. Dans le cas d'un spectromètre de masse en tandem, ces ions vont être fragmentés par un gaz de collision (hélium) en ions fils qui seront à nouveau sélectionnés selon leur valeur m/z (Figure 10).

Ainsi, le temps de rétention associé à une double identification du composé permet d'avoir une empreinte très spécifique de la molécule. Elle présente aussi l'avantage d'éliminer les molécules ayant une structure chimique similaire aux composés étudiés. Cette étape est souvent réalisée dans un premier temps pour chaque composé pris individuellement, avant d'être optimisée pour identifier l'ensemble des composés dans une seule analyse, selon les attentes de la méthode.

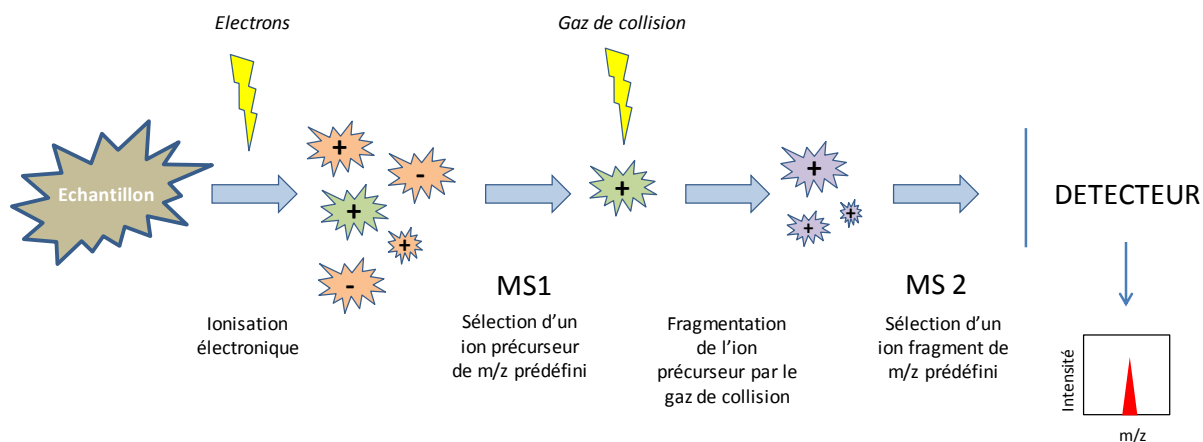


Figure 10. Principe de la fragmentation des composés par un spectromètre de masse (MS) en tandem

Une fois la méthode instrumentale choisie, un traitement chimique de la matrice contenant les composés doit être réalisé. Ce processus est plus complexe et plus long. L'extraction dépend du nombre de molécules à isoler, de leurs propriétés chimiques, de la quantité et de la nature de la matrice (eau, matrice biologique...). La difficulté de l'extraction réside dans le compromis entre un extrait exempt de résidus matriciels et présentant un taux de récupération satisfaisant (entre 80 et 120 %) pour le composé d'étude. Le taux de récupération correspond à l'écart mesuré entre la valeur expérimentale et théorique de la teneur en molécule. La présence d'une quantité importante de résidus matriciels dans l'échantillon peut entraîner, au cours des analyses, une augmentation du bruit du fond provoquant des perturbations lors de l'identification et la détection des molécules étudiées. Pour corriger les pertes dues à l'extraction ou à l'analyse, des étalons internes peuvent être ajoutés à une concentration connue. La réponse de ces molécules au niveau analytique (extraction, dosage) doit être similaire au composé étudié : l'étalon interne peut être par exemple la molécule d'étude avec un poids moléculaire différent (marquage au carbone 13). Dans le cas d'une matrice très chargée en lipides ou protéines (graisse, aliment), il est parfois nécessaire d'ajouter une étape de purification lors de l'extraction de l'échantillon. Une fois la mise au point analytique et l'extraction réalisée, plusieurs paramètres sont évalués pour qualifier la méthode analytique.

II.1.b. Critères d'évaluation de la performance d'une méthode analytique

Plusieurs critères sont vérifiés pour qualifier les performances de la méthode d'analyse. Ils ont pour but d'évaluer la capacité de la méthode à annoncer la concentration exacte lors d'un dosage (Ducauze 2014; IPCS 1986). Dans un premier temps, la limite de détection d'un composé (LOD) de la méthode permettra d'évaluer la capacité de la méthode à détecter des concentrations très basses. Son signal est le plus souvent égal à trois fois le signal provoqué par le bruit provenant de la matrice. La méthode analytique est le plus souvent caractérisée par sa limite de quantification (LOQ), valeur plus intéressante dans le cadre des applications toxicologiques. La LOQ est la plus faible concentration de composé pouvant être dosée, de manière exacte et précise, dans les conditions expérimentales. Trois fois supérieure à la LOD, sa valeur correspond le plus souvent au premier point de la gamme de calibration servant à quantifier les concentrations en composé. Ainsi, un composé peut être détectable mais non quantifiable. Les valeurs de LOD et LOQ vont dépendre du degré de pureté de l'extrait et de la sensibilité de l'appareil de mesure. Le processus d'évaluation d'une méthode analytique suit communément l'étude des critères suivants (Shabir *et al.* 2007):

- **Domaine de linéarité** : l'étendu du domaine de linéarité sera mise en face de la gamme de concentrations. L'idéal est que la méthode d'analyse choisie puisse couvrir la gamme de concentrations de l'étude, afin d'éviter de réaliser des dilutions.
- **Sensibilité** : la sensibilité d'une méthode est évaluée par la pente de la droite d'étalonnage. Une méthode sensible permet de distinguer facilement deux échantillons de concentrations voisines.
- **Exactitude** : cela correspond au degré de concordance entre la valeur mesurée et la valeur théorique de concentration en composé.
- **Précision** (ou aussi justesse) : cela équivaut au degré d'accord entre les résultats obtenus lors de différents essais (dispersion).
- **Répétabilité** (ou aussi fidélité): cette mesure de la variation des résultats au sein d'un même laboratoire caractérise la précision obtenue lorsque la méthode est répétée par le même

analyste dans les mêmes conditions (réactifs, matériel, réglage, laboratoire) dans un court intervalle de temps (variabilité intra jour, par exemple).

- **Reproductibilité** : cela correspond à la précision de la méthode lorsqu'elle est appliquée dans des conditions différentes (autre laboratoire, par exemple) à des échantillons distincts, mais provenant du même lot. La reproductibilité peut aussi être évaluée par la variation des résultats obtenus sur le dosage d'un échantillon toujours préparé de façon identique (point de gamme de concentrations, par exemple) à différentes dates.
- **Robustesse** : cela correspond à la capacité d'une méthode d'annoncer des résultats d'une exactitude et d'une précision acceptable dans des conditions diverses. Elle permet d'évaluer l'influence des changements extérieurs (appareil, solvant) sur les résultats obtenus pour un échantillon provenant toujours du même lot.

Selon le contenu de la méthode et les exigences de qualité liées à son utilisation future (qualité Bonnes Pratiques de Laboratoire ou du Comité français d'accréditation), les critères de validation sont plus ou moins stricts (CEAEQ 2009). Au minima trois tests pour chaque critère doivent être réalisés et les résultats doivent être compris dans l'intervalle 80 – 120 %. Les sources d'incertitudes sur les données obtenues peuvent venir de l'étape d'extraction et de la justesse de la méthode.

II.1.c. Méthodes analytiques développées pour quantifier les pyréthriinoïdes et leurs métabolites

Les méthodes de détermination des pyréthriinoïdes, perméthrine en particulier, et de ses métabolites ont évoluées au cours des années. Le choix des méthodes d'analyse a varié en fonction de l'évolution technologique, et des matrices dans lesquelles les composés étaient présents (Tableau 7).

La quantification simultanée de la perméthrine et de ses métabolites, 3-PBA et ses formes oxydées le plus souvent, a d'abord été effectuée par HPLC-UltraViolet (UV) dans des matrices biologiques comme le plasma, le cerveau, le foie et l'intestin (Anadon *et al.* 1991; Choi *et al.* 2002; Nakamura *et al.* 2007). La GC-MS couplée à différents modes d'ionisation a été ensuite adoptée pour chercher ces composés dans les urines ou le plasma (Leng and Gries 2005; Leng *et al.* 1997). La méthode LC-MS/MS, permettant d'atteindre une LOQ plus basse, est désormais privilégiée. Cette méthode a permis de quantifier, dans le cerveau et le sang, plusieurs pyréthriinoïdes comme la deltaméthrine, la *cis*- et *trans*-perméthrine et la cyperméthrine et leurs métabolites (Starr *et al.* 2014). Au fil des méthodes, la valeur de la LOD de la perméthrine dans le sang est passée de 0,1 mg/L par HPLC-UV (Anadon *et al.* 1991) à 5 µg/L (plasma) par GC- détecteur à capture d'électrons (ECD) (Leng *et al.* 1997) pour diminuer encore à 0,3 µg/L par LC-MS/MS (Starr *et al.* 2012).

Pour l'analyse du composé parent, l'utilisation d'une colonne chirale a permis de séparer les quatre stéréoisomères de la perméthrine présents dans le sang, foie, cerveau et graisse, associée à une HPLC-UV (Jin *et al.* 2008) puis à une LC-MS/MS (Starr *et al.* 2012).

Pour la recherche exclusive des métabolites dans les urines lors des études de biosurveillance, de même, la GC-MS était le plus souvent utilisée (Leng and Gries 2005; Schettgen *et al.* 2002b) faisant place actuellement à la LC-MS/MS (Baker *et al.* 2003; Le Grand *et al.* 2012). La valeur des LOQ s'avèrent cependant similaires.

Simultanément aux différentes méthodes de dosage des pyréthriinoïdes, des méthodes relatives à la conservation et à la préparation de l'échantillon ont été étudiées (Leng *et al.* 1997; Schettgen *et al.* 2002b).

Tableau 7. Valeurs des LOD et LOQ du 3-PBA, *cis*-DCCA, *trans*-DCCA, *trans*-perméthrine et *cis*-perméthrine obtenues dans des matrices biologiques liquides (urine, sang, plasma) et solides (cerveau, foie, graisse) par différentes techniques d'analyses

Etudes	Méthodes Matrices	3-PBA	<i>Cis</i> -DCCA	<i>Trans</i> -DCCA	<i>Trans</i> - perméthrine	<i>Cis</i> - perméthrine
		LOD (LOQ)	LOD (LOQ)	LOD (LOQ)	LOD (LOQ)	LOD (LOQ)
Anadon <i>et al.</i> (1991)	HPLC-UV					
	<i>Plasma</i>	100 (-)	-	-	100 (-)	100 (-)
	<i>Foie</i>	200 (-)	-	-	200 (-)	200 (-)
Leng <i>et al.</i> (1997)	GC-MS					
	<i>Urine</i>	0,5 (-)	-	-	-	-
	GC-ECD					
	<i>Plasma</i>	-	-	-	5 (-)	5 (-)
Leng <i>et al.</i> (2005)	GC-HRMS					
	<i>Urine</i>	0,02 (-)	0,02 (-)	0,02 (-)	-	-
Le Grand <i>et al.</i> (2012)	LC-MS/MS					
	<i>Urine</i>	0,015 (0,025)	0,015 (0,020)	0,015 (0,030)	-	-
Starr <i>et al.</i> (2012)	LC-MS/MS					
	<i>Sang</i>	-	-	-	- (0,3)	- (0,3)
	<i>Cerveau</i>	-	-	-	- (3)	- (3)
	<i>Graisse</i>	-	-	-	- (3)	- (3)
Starr <i>et al.</i> (2014)	LC-MS/MS					
	<i>Sang</i>	0,19 (0,64)	0,29 (0,96)	0,46 (1,53)	0,02 (0,06)	0,09 (0,29)
	<i>Cerveau</i>	1,4 (4,7)	0,74 (2,45)	1,46 (4,86)	0,31 (1,04)	0,15 (0,49)

HRMS : spectromètre de masse à haute résolution

La stabilité dans les urines des métabolites *cis*-DCCA, *trans*-DCCA et F-PBA a été étudiée sur 30 jours à +4 °C et pendant un an à -21 °C. La décroissance moyenne entre les concentrations obtenues à ces deux tests est faible à 11 ± 3 %, valeur correspondant au coefficient de variation de la méthode. La stabilité dans le plasma des composés parents perméthrine, cyperméthrine et cyfluthrine a aussi été étudiée. En effet, les estérases impliquées dans l'hydrolyse des pyréthriinoïdes peuvent encore agir une fois l'échantillon isolé. L'effet de l'acide formique 1 % (v/v), inhibiteur total des cholinestérases, a été testé. La stabilité de l'échantillon a été évaluée sur huit jours à deux températures (+4 °C et -21 °C). A +4 °C, sans acide formique, les valeurs des concentrations en perméthrine diminuaient d'environ 33 %. L'ajout d'acide formique à +4 °C n'améliorait pas la stabilité. En revanche, la présence d'acide formique avait un impact sur la conservation des échantillons à -21 °C. Après huit jours, le pourcentage de perte de perméthrine sans acide formique était de 37,5 ± 3,8 % alors qu'en présence d'acide formique, les concentrations en perméthrine restaient stables. Pour les autres pyréthriinoïdes, même si une diminution des concentrations avait lieu en présence d'acide formique, celle-ci était plus faible qu'en son absence (Leng *et al.* 1997). Un autre inhibiteur d'estérase, le bis-nitrophényl phosphate, a aussi été utilisé sur des préparations tissulaires (Jewell *et al.* 2007; Nakamura *et al.* 2007).

Les métabolites issus des pyréthriinoïdes existent sous forme libre et conjugué. Afin de doser le métabolite sous ses deux formes, les composés présents dans l'échantillon peuvent être traités par différentes approches pour casser les liaisons de conjugaison. Certaines études ont eu recours à de l'acide chlorhydrique (37 %). L'échantillon, une fois l'acide chlorhydrique ajouté, était chauffé pendant

1 h à +90 °C (Schettgen *et al.* 2002b) ou 2 h à +100 °C (Leng and Gries 2005). Le recours à des enzymes, de types β -glucuronidases ou sulfatases, est envisageable, consistant à mettre en contact l'échantillon avec les enzymes pendant 16 h à +37 °C en milieu acide (pH = 4,5) (Baker *et al.* 2003; Le Grand *et al.* 2012).

II.2. Elaboration des études de toxicocinétiques *in vivo*

Avant la réalisation d'expériences *in vivo* chez l'animal, il est nécessaire d'avoir une vue d'ensemble sur les études déjà réalisées. La réalisation de nouvelles expériences chez l'animal doit avoir comme objectif d'apporter une information supplémentaire pour la compréhension de la cinétique du composé (nouvelle voie d'exposition par exemple). Le plan expérimental se basera sur les données déjà publiées sur la molécule et sur de nouvelles expériences pour répondre aux questions de cinétique posées.

Les études de cinétique chez l'animal consistent à administrer une dose définie du composé par la voie d'administration désirée et à effectuer des prélèvements de sang et/ou d'organes et/ou matrices d'excrétion à différents temps. La dose administrée choisie doit permettre une détection du composé dans l'ensemble des tissus pour répondre aux impératifs de la méthode analytique. Chez l'animal, le prélèvement de sang, d'urine et de fèces est réalisable respectivement par la mise en place de cathéter ou l'utilisation de cage à métabolisme (Figure 11). Un même rat ne pouvant renseigné toute la cinétique du composé dans le tissu, l'approche suivante sera utilisée. Le début de l'exposition sera le même pour tous les rats, puis un animal différent sera sacrifié à un temps voulu. Le composé administré peut être radiomarké dans le cas où la cinétique du composé est peu connue : cela permettra de doser la radioactivité dans les différents organes ou fluides.

Plusieurs points sont cruciaux pour s'assurer de générer des données exploitables par la suite (Lipscomb *et al.* 2012). Le choix des temps de prélèvement est primordial pour rendre compte des phases complètes d'absorption et d'élimination du composé. Des temps rapprochés en début d'expérience permettent de caractériser la vitesse d'absorption du composé, et des temps longs de représenter l'ensemble du processus d'élimination. Les modèles PBPK de molécules au profil cinétique similaire à celui de la molécule étudiée peuvent être une aide pour l'élaboration du plan expérimental (Lipscomb *et al.* 2012). Les résultats des simulations de profils cinétiques guideront le choix de la dose. Elles permettront de s'assurer de la détection du composé dans chacun des tissus à des concentrations supérieures à la LOQ et de souligner aussi les temps importants de la cinétique. L'espèce retenue pour l'étude doit présenter une cinétique de la molécule comparable à celle de l'homme. Souvent, le rat est choisi car il est facilement manipulable et permet d'isoler une matrice en quantité suffisante pour l'étape de dosage analytique. Le choix du nombre d'animaux par temps doit permettre d'obtenir des résultats statistiquement exploitables, dans les limites de l'éthique.



Figure 11. Cage à métabolisme pour le rat

II.3. Analyse des données cinétiques via les modèles PBPK

La modélisation de la cinétique *in vivo* permet de quantifier et d'exploiter davantage les données *in vivo* obtenues. Les modèles PBPK sont des modèles mathématiques permettant de décrire les processus ADME de la molécule, en se basant sur la physiologie de l'individu et les propriétés physico-chimiques de la molécule (Reddy *et al.* 2013; Rowland *et al.* 2011). Fonctionnant sur le principe de transfert de masse, le modèle regroupe les organes du corps assimilés à des compartiments, reliés par le sang, et dans lesquels est suivie l'évolution des concentrations en composé en fonction du temps.

Face au nombre croissant de modèles PBPK publiés, des règles de bonnes pratiques ont fait l'objet de plusieurs publications afin de promouvoir un cadre de développement commun aux modèles PBPK et d'ainsi accroître la confiance d'utilisateurs potentiels (Campbell *et al.* 2012; Loizou *et al.* 2008; Nestorov 2007). Le développement d'un modèle PBPK suit toujours le même processus. La structure du modèle est d'abord élaborée, basée sur les caractéristiques physiologiques de l'espèce, les propriétés physico chimiques de la molécule ainsi que son mode d'action. Une fois la structure établie, les valeurs des paramètres physiologiques et spécifiques de la molécule doivent être renseignées afin de pouvoir réaliser des simulations. Enfin, le modèle défini et paramétré est implémenté dans un logiciel. Il est ensuite évalué afin d'évaluer son aptitude à reproduire une situation expérimentale différente (Figure 12).

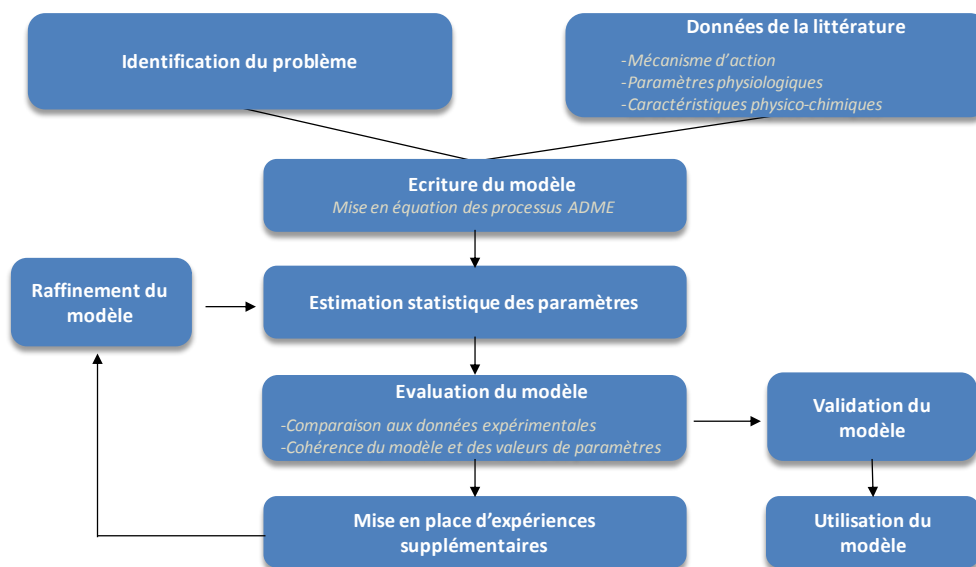


Figure 12. Les différentes étapes de construction et de développement d'un modèle PBPK

II.3.a. Structure d'un modèle PBPK

Un modèle PBPK a pour objectif de décrire de manière plus ou moins détaillée le devenir d'une substance dans un organisme vivant. La structure d'un modèle PBPK repose sur l'anatomie et la physiologie de cet organisme mais aussi sur les interactions entre les tissus et la substance. Dans la majorité des cas, il n'est pas nécessaire de décrire de manière exhaustive l'ensemble des tissus et organes composant l'organisme et seuls les organes ou tissus nécessaires à la description des processus ADME sont retenus. En particulier sont toujours présents :

- Les voies d'entrée ou d'absorption (le tractus gastro-intestinal, les poumons ou la peau),
- Les organes cibles c'est-à-dire là où l'action toxique ou thérapeutique a lieu,
- Les sites de métabolisme (par exemple, le foie, les intestins ou les poumons),
- Les sites de stockage (par exemple, les tissus adipeux ou les os),
- Les voies d'élimination,
- Les tissus ou fluides pour lesquels des données expérimentales ont été observées,
- Un fluide permettant de lier les différents compartiments entre eux (généralement, le sang).

Certains tissus non essentiels à la description des processus ADME peuvent être regroupés selon leur affinité pour le composé et leur degré de perfusion (Nestorov *et al.* 1998). Généralement, ces tissus sont agrégés en deux compartiments nommés « faiblement perfusés » (par exemple, les muscles et la peau) et « rapidement perfusés » (les viscères). D'autres méthodes d'agrégation basées uniquement sur la structure mathématique du modèle ont été aussi appliquées aux modèles PBPK (Brochot *et al.* 2005; Dokoumetzidis and Aarons 2009). Un exemple de modèle PBPK générique est présenté Figure 13.

Deux dernières composantes importantes à prendre en compte lors de la construction d'un modèle PBPK sont : i) la question à laquelle l'exercice de modélisation doit répondre ; et ii) les données expérimentales disponibles au moment de l'étude pour la vérification du modèle. En fonction de ce questionnement et des données, différentes structures de modèle PBPK peuvent être proposées pour le même composé chez une même espèce (Brochot *et al.* 2007; Kohn and Melnick 1993). Les différences entre les modèles pour une même molécule se situent généralement au niveau de la description de l'anatomie (nombre de compartiments), ce qui peut par la suite affecter le nombre de sites de métabolisme ou de stockage en fonction de l'agrégation de certains tissus.

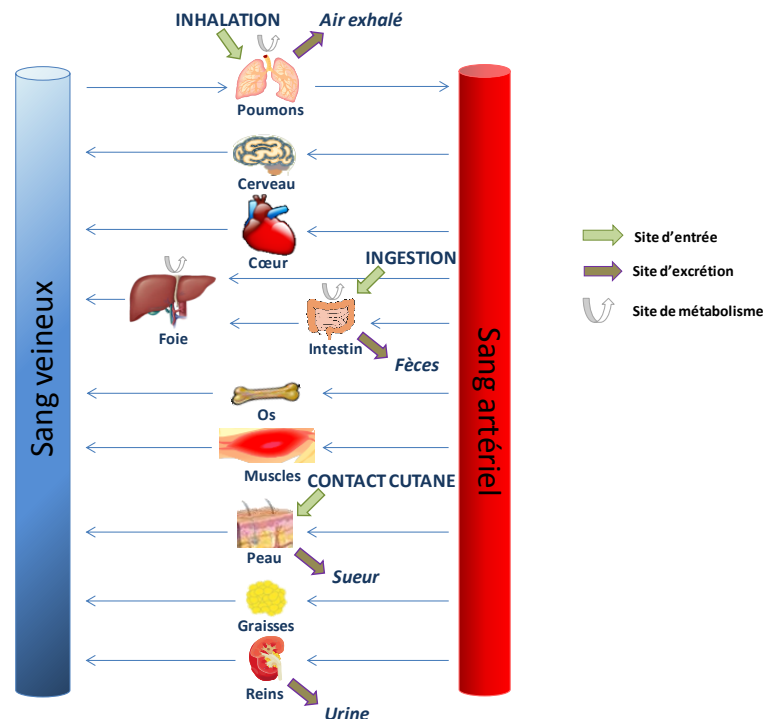


Figure 13. Exemple de modèle PBPK comprenant différents sites d'absorption et d'excrétion

Un modèle PBPK comporte donc rarement une description exhaustive de l'organisme. La raison principale reste la difficulté d'obtenir des informations précises pour paramétrer le modèle. Plus le modélisateur souhaite décrire de façon détaillée les processus ADME au sein de chaque tissu ou organe, plus la complexité du modèle augmente. Cette complexité se traduit par un nombre important de paramètres à identifier et donc une augmentation du nombre de données nécessaires à la vérification ou validation du modèle. C'est pourquoi un équilibre doit être généralement obtenu entre une représentation simplifiée mais réaliste (Clewell and Clewell 2008).

II.3.b. Mise en équation des processus ADME

L'ensemble des processus ADME subis par la molécule sont transcrits sous la forme d'équations différentielles. Dans la majorité des modèles PBPK, les échanges entre les différents compartiments sont basés sur le transfert de masse *via* la circulation sanguine.

II.3.b.i. Absorption

L'absorption s'effectue par différentes voies : l'inhalation (voie pulmonaire), le contact cutané, l'ingestion (voie orale) ou l'injection par intraveineuse. Un ensemble de mécanismes complexes régit le passage de la substance entre le site d'administration et la circulation sanguine, que seule une fraction atteindra (à l'exception de l'injection par intraveineuse qui introduit directement le composé dans la circulation sanguine). La quantité de molécule absorbée dépend de la dose, de la voie d'administration, de la durée d'exposition, des propriétés physico-chimiques de la molécule (solubilité, vitesse de dissolution) et de la nature du transport emprunté par la molécule à travers les membranes cellulaires. Pour chaque voie d'exposition, la modélisation de ces mécanismes repose sur un nombre limité de paramètres spécifiques à la substance et sur la description physiologique des sites d'administration. Selon le type de molécules et des données existantes, plusieurs modèles sont disponibles pour chaque voie d'administration avec des niveaux de détails différents. Des modèles d'absorption pour les voies orale et pulmonaire sont présentés ci-dessous.

Le modèle d'absorption orale le plus simple suppose le passage du composé de l'intestin vers la circulation porte hépatique selon une constante de vitesse d'ordre 1. Cette représentation considère que le tractus gastro-intestinal est un compartiment homogène et que la totalité du composé administré rejoint la circulation systémique. Ce modèle n'est pas valable pour toutes les molécules et une description plus fine du tractus gastro-intestinal et des interactions entre ce dernier et la molécule peut être requise (Huang *et al.* 2009). Ainsi le modèle CAT (Compartmental Absorption and Transit), développé pour des composés se dissolvant immédiatement dans l'estomac (Yu *et al.* 1996), propose de diviser le tractus gastro-intestinal en 3 segments représentant l'estomac, l'intestin grêle et le côlon. Peuvent être également pris en compte la vitesse de dissolution du composé, la fraction disponible ou encore la saturation de l'absorption (Yu and Amidon 1998, 1999). D'autres modèles basés sur le modèle CAT ont été développés ensuite, comme les modèles ACAT (Advanced CAT) et ADAM (Advanced Dissolution, Absorption, Metabolism). Les ajouts majeurs du modèle ACAT sont la description de 6 états de la molécule rendant compte de ses facteurs physico-chimiques (pKa, solubilité, perméabilité) et des facteurs physiologiques de l'individu (vidange gastrique, transport et métabolisme intestinal). Ces modèles décrivent les transferts entre compartiments et les interactions de la molécule avec les tissus intestinaux (Agoram *et al.* 2001; Chow and Pang 2013). Quant au

modèle ADAM, il permet de segmenter l'intestin en précisant leurs flux sanguins et l'activité du métabolisme et du transport (Darwich *et al.* 2010).

La modélisation de la voie pulmonaire consiste, quant à elle, à représenter les échanges entre l'alvéole pulmonaire, site d'entrée et d'excrétion du composé, et le capillaire sanguin, lieu d'absorption du composé (Figure 14).

En supposant un flux d'air constant dans les poumons et un équilibre rapide entre l'air et le sang alvéolaire, la concentration sanguine artérielle est donnée par (Ramsey and Andersen 1984):

$$C_{art} = \frac{P_{S:A} (F_{pul} \times C_{inh} + F_{card} \times C_{ven})}{P_{S:A} \times F_{card} + F_{pul}} \quad (1)$$

$$C_{exh} = \frac{C_{art}}{PC_{S:A}} \quad (2)$$

où C_{alv} , C_{art} , C_{ven} , C_{inh} et C_{exh} correspondent respectivement à la concentration dans le sang alvéolaire, artériel et veineux et dans l'air inhalé et exhalé. F_{card} , F_{alv} et F_{pul} sont respectivement les flux sanguins cardiaque, alvéolaire et pulmonaire. $PC_{S:A}$ est le coefficient de partage du composé entre le sang et l'air. Cette description des échanges gazeux est notamment utilisée pour les composés organiques volatiles (Reddy *et al.* 2005).

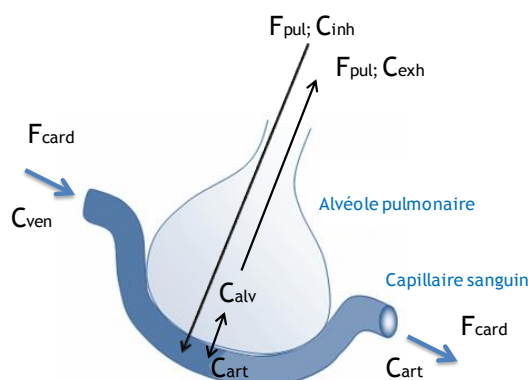


Figure 14. Représentation des échanges alvéolaires entre le sang et l'air. Les paramètres F_{card} , F_{alv} et F_{pul} sont respectivement les flux sanguins cardiaque, alvéolaire et pulmonaire. C_{alv} , C_{art} , C_{ven} , C_{inh} et C_{exh} correspondent respectivement à la concentration dans le sang alvéolaire, artériel et veineux et dans l'air inhalé et exhalé

II.3.b.ii. Distribution

La distribution correspond à la répartition de la molécule dans les différents organes du corps. La molécule, présente dans la circulation sanguine, passe du sang vers les organes selon son affinité pour ces derniers. Le processus de distribution dépend de plusieurs facteurs : l'état d'ionisation de la molécule, son caractère lipophile, mais aussi la composition des organes, la perméabilité des membranes tissulaires ou encore la perfusion des tissus. La distribution est caractérisée par le coefficient de partage tissu sur sang ($PC_{T:S}$) défini comme le rapport de la concentration de la substance dans le tissu, C_T , sur celle dans le sang veineux, C_{ven} , lorsque les deux milieux sont à l'équilibre (Rowland 1985).

La distribution d'une molécule au sein d'un tissu peut être limitée par la perfusion de ce tissu ou bien par la perméabilité tissulaire (Gerlowski and Jain 1983). Selon la nature de la distribution, les équations régissant l'évolution de la quantité de molécule au sein du tissu diffèrent. Lors d'une distribution limitée par la perfusion, la molécule est supposée se distribuer uniformément et instantanément dans le volume total du tissu. Sont concernées principalement les molécules de faibles poids moléculaires, lipophiles ou possédant un transport de type diffusion passive ou facilitée. Ce transport bidirectionnel laisse diffuser les molécules selon la loi de Fick (Sugano *et al.* 2010). Ainsi, dans un tissu sans processus d'absorption ou d'élimination, l'évolution de la quantité Q_T dans le tissu est donnée par :

$$\frac{dQ_T(t)}{dt} = Flux_T \times \left(C_{art}(t) - \frac{C_T(t)}{PC_{T:S}} \right) \quad (3)$$

avec C_{art} la concentration dans le sang artériel, C_T la concentration dans le tissu et F_T le flux sanguin. Dans le cas d'une limitation par la diffusion, la distribution de la molécule est dépendante de la perméabilité de l'organe. Sont souvent concernés le cerveau, les graisses ou encore la peau (Godin *et al.* 2010; McDougal *et al.* 1986). Afin de retranscrire la lenteur du processus, l'organe est subdivisé en deux sous-compartiments : l'espace extracellulaire correspondant à la vascularisation du tissu et l'espace intracellulaire. La surface d'échange entre les deux compartiments est représentée par le coefficient de perméabilité PA_T (dont l'unité est volume/temps/poids de tissu). Les quantités dans l'espace vasculaire et le tissu sont respectivement :

$$\begin{aligned} \frac{dQ_{SgT}(t)}{dt} &= F_T \times (C_{art}(t) - C_{SgT}(t)) - PA_T \times \left(C_{SgT}(t) - \frac{C_T(t)}{PC_{T:S}} \right) \\ \frac{dQ_T(t)}{dt} &= PA_T \times \left(C_{SgT}(t) - \frac{C_T(t)}{PC_{T:S}} \right) \end{aligned} \quad (4)$$

Les deux modèles de distribution sont représentés Figure 15.

Enfin, il arrive qu'aucune de ces deux représentations ne parvienne à représenter correctement la cinétique de distribution du composé. L'inclusion du mécanisme de transport de la molécule peut alors être envisagée, en particulier si ce dernier est de type actif (Watanabe *et al.* 2010). En effet, les transporteurs actifs présents sur les membranes cellulaires et couplés à une source d'énergie permettent aux molécules (en particulier ionisées et hydrophiles) de traverser les membranes, indépendamment de leurs gradients de concentration. Les transporteurs peuvent être soit d'influx soit d'efflux, laissant respectivement entrer ou sortir la molécule de la cellule (Giacomini *et al.* 2010; Micalef *et al.* 2005). Ces transporteurs, présents dans la plupart des organes (intestin, foie, rein), peuvent être saturés au-delà d'une certaine concentration en composé, limitant sa distribution (Giacomini and Sugiyama 2010; Sugano *et al.* 2010).

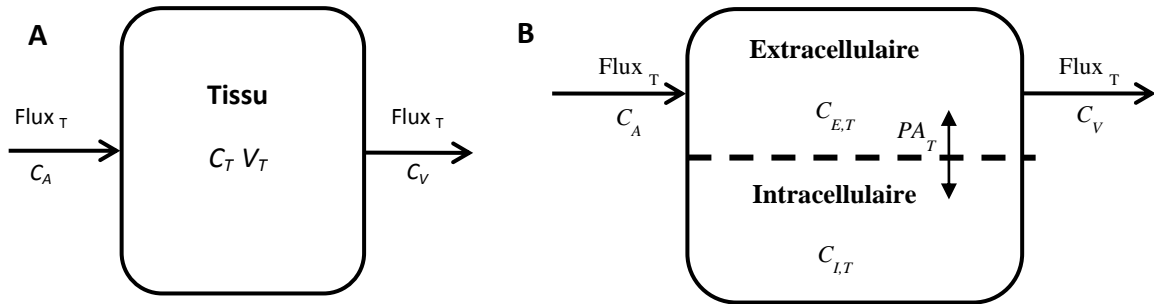


Figure 15. Représentation de la distribution du composé dans un organe à perfusion limitée (A) et un organe à diffusion limitée (B). C désigne les concentrations dans, respectivement, l'artère (C_A), le tissu (C_T), la veine (C_V), l'espace extracellulaire ($C_{E,T}$) et intracellulaire ($C_{I,T}$). V_T correspond au volume tissulaire et PA_T au coefficient de perméabilité entre les deux sous compartiments

II.3.b.iii. Métabolisme

Le métabolisme correspond à la transformation de la molécule parente en un ou plusieurs autre(s) composé(s), appelé métabolite(s). La molécule parente peut être transformée en métabolites actifs (thérapeutique ou toxique) ou bien être détoxifiée lorsqu'elle est déjà active. La réaction métabolique est catalysée par des enzymes, tels que les cytochromes P450 (CYP) pour le métabolisme de phase I ou les sulfotransférases ou glutathion transférases pour le métabolisme de phase II (Jancova *et al.* 2010). Le métabolisme de phase II permet généralement d'aboutir à la formation de composés conjugués hydrosolubles facilement éliminés *via* les urines ou la bile. En raison de la quantité d'enzymes présente dans les organes, le métabolisme a lieu de manière très importante dans le foie et plus faiblement dans les intestins, les poumons ou les reins (Anzenbacher and Anzenbacherova 2001). Le métabolisme aura un impact dès l'ingestion d'une molécule sur sa biodisponibilité, c'est-à-dire la fraction qui atteint la circulation systémique, en raison du métabolisme intestinal et du premier passage hépatique, où sont présents transports actifs et enzymes.

Le processus de disparition du composé est caractérisé par la clairance, correspondant à la capacité d'un organe à épurer le sang du composé par unité de temps (Wilkinson 1987). Quand cette capacité est considérée indépendamment des facteurs physiologiques influant sur la clairance globale de l'organe (par exemple, le débit sanguin tissulaire et la fraction libre de substance dans le sang), la clairance est dite intrinsèque. Le métabolisme d'une substance est généralement décrit par un processus d'élimination de premier ordre ou par un processus non-linéaire tel que la relation saturable de type Michaelis-Menten.

Dans le cas d'un processus saturable, la cinétique d'élimination du composé peut être modélisée par l'équation de Michaelis-Menten. L'élimination est alors caractérisée par deux paramètres V_{max} et K_m . K_m , appelée constante de Michaelis, représente l'affinité entre le substrat et l'enzyme, et V_{max} la vitesse maximale de transformation du substrat (Hacker *et al.* 2009). L'évolution de la quantité de matière au sein de l'organe est alors :

$$\frac{dQ_T(t)}{dt} = Flux_T \times \left(C_{art}(t) - \frac{C_T(t)}{PC_{T:S}} \right) - \frac{V_{max} \times C_T(t)}{K_m + C_T(t)} \quad (5)$$

Lorsque la concentration en substrat est bien inférieure à celle du K_m (ordre 1), la relation devient linéaire entre la vitesse d'élimination et la concentration en substrat et l'équation 5 peut alors être simplifiée en :

$$\frac{dQ_T(t)}{dt} = Flux_T \times \left(C_{art}(t) - \frac{C_T(t)}{PC_{T:S}} \right) - CL_H \times C_T(t) \quad (6)$$

avec CL_H la clairance de l'organe correspondant au ratio V_{max} sur K_m .

II.3.b.iv. Excrétion

Ce phénomène correspond à l'élimination du composé (molécule parente et/ou métabolites) de l'organisme. Les voies d'élimination peuvent être la voie rénale, fécale, pulmonaire, ou s'effectuer par le biais de la sueur ou du lait maternel. Le rein reste cependant l'organe principal d'élimination. Comme pour le métabolisme, une clairance rénale du composé est déterminée, permettant de lier les concentrations sanguines et urinaires du composé. L'équation 6 est aussi applicable dans ce contexte.

II.3.c. Paramétrisation des modèles PBPK

Une fois la structure du modèle PBPK établie, il est nécessaire d'informer les valeurs des paramètres avant de réaliser des simulations. L'ensemble des paramètres d'un modèle PBPK se compose de paramètres relatifs à l'anatomie de l'individu et aux processus physiologiques sous-jacents (tels que les volumes des organes ou les flux sanguins), de paramètres biochimiques spécifiques de la molécule étudiée et caractéristiques de ses propriétés pharmacocinétiques (tels que les coefficients de partage ou les constantes d'élimination), et de paramètres relatifs à l'exposition, c'est-à-dire la dose et la durée d'exposition, uniquement nécessaires à la conduite de simulations. Parmi ces paramètres, certains sont directement mesurables et donc connus (par exemple, les paramètres relatifs à l'anatomie de l'organisme). Pour les paramètres non-observables, différentes approches sont envisageables : la mise en place d'expérimentations *in vitro* dédiées à l'estimation d'un paramètre, l'utilisation de modèles « relation quantitative structure à activité » (QSAR) ou encore la calibration du modèle PBPK à des données expérimentales de cinétique.

II.3.c.i. Paramètres observables

Les paramètres physiologiques et anatomiques sont, en général, les seuls paramètres directement observables ou mesurables. Ils regroupent entre autres la masse corporelle, les volumes des organes, les flux sanguins, les temps de transits intestinaux... Pour une population humaine, seuls quelques paramètres démographiques, tels que la masse corporelle, la taille, l'âge et le sexe, sont typiquement mesurés lors d'une étude. Des relations entre ces paramètres démographiques et les paramètres physiologiques ont été proposées afin de pouvoir tenir compte des variations entre les individus. Ainsi il est possible de calculer les volumes de chacun des organes à partir de la masse, puisque ceux-ci sont référencés en pourcentage de masse corporelle. De même les flux sanguins de chaque organe sont typiquement exprimés en fonction du débit cardiaque. La majorité des espèces utilisées en toxicologie et pharmacologie ayant fait l'objet de nombreuses études portant sur leur anatomie, ces paramètres sont bien connus et référencés dans la littérature (Brown *et al.* 1997; ICRP 2002).

II.3.c.ii. Estimation *in vitro* des paramètres

L'expérimentation *in vitro* offre la possibilité de s'intéresser aux processus ADME de manière sélective afin d'estimer certains paramètres des modèles PBPK à partir de tests sur des cellules animales ou humaines (cellules, fractions cellulaires, micro-coups de tissu). Les tests *in vitro* peuvent être réalisés au sein d'environnement de culture à l'échelle macroscopique ou microscopique (puits de culture). Ces environnements sont en général artificiels, mais certains dispositifs expérimentaux récemment développés, tels que les microsystèmes perfusés, permettent une reproduction proche d'un environnement *in vivo* (Prot *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2009).

De nombreux modèles cellulaires de référence existent suivant le processus à reproduire.

Ainsi, l'absorption par voie orale caractérisée par la biodisponibilité et la perméabilité apparente pourra être déterminée sur un système *in vitro* polarisé, composé d'un compartiment donneur (apical) et d'un compartiment récepteur (basolatéral) séparés par une membrane où sont cultivées des cellules Caco-2 (cellules cancéreuses de côlon) ou des cellules MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) (Balimane and Chong 2005; Bohets *et al.* 2001; Irvine *et al.* 1999). La lignée cellulaire Caco-2 est souvent utilisée pour prédire l'absorption intestinale de nombreuses substances, car cette lignée montre des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles similaires à celles des cellules épithéliales de l'intestin grêle sous des conditions de culture spécifiques. L'absorption cutanée est étudiée dans des systèmes d'exposition similaires avec des peaux natives animales ou humaines, des peaux artificielles ou encore des peaux reconstruites (Ehrhardt *et al.* 2008; Netzaff *et al.* 2005; Wagner *et al.* 2001).

La caractérisation du métabolisme, essentiellement au niveau hépatique, par expérimentations *in vitro* se fait par la mise en contact de la molécule sur des cellules ou fractions hépatiques. La déplétion de la molécule ou l'apparition des métabolites est observée afin d'estimer une clairance *in vitro*, à laquelle des facteurs correctifs seront ensuite appliqués afin de l'extrapoler *in vivo* (Houston 1994a; Riley *et al.* 2005).

II.3.c.iii. Estimation QSAR des paramètres

Les modèles QSAR regroupent diverses méthodes statistiques de régression ou de classification permettant de corréliser la structure chimique d'une molécule à une activité ou propriété physico-chimique. Ces modèles sont basés sur le principe selon lequel des molécules ayant des structures chimiques similaires auront des activités similaires. La molécule peut être caractérisée par des descripteurs de sa structure (par exemple, les groupements chimiques identifiés, la structure dans l'espace,...) ou par des propriétés physico-chimiques (par exemple, l'ionisation ou la lipophilie). Pour paramétrer les modèles PBPK, les modèles QSAR sont utilisés pour estimer soit certaines propriétés physico-chimiques non connues, soit directement certains paramètres spécifiques des molécules au sein des processus ADME. Par exemple, de nombreux modèles QSAR ont été développés afin de prédire l'affinité des molécules pour les tissus à partir de la lipophilie et de la composition des tissus (Balaz and Lukacova 1999; Poulin and Theil 2000), la perméabilité cutanée (Moss *et al.* 2002; Riviere *et al.* 2011), ou encore la biodisponibilité des molécules (Raevsky *et al.* 2000; Wessel *et al.* 1998). Le développement de modèles QSAR ne rencontre pas autant de succès pour d'autres processus ADME. Par exemple, la qualité des prédictions est moins satisfaisante pour la prédiction de la clairance métabolique pour laquelle les approches *in vitro* et *in vivo* sont encore préférées (Peyret and Krishnan 2011).

II.3.c.iv. Estimation statistique des paramètres

Lorsque des données *in vivo* humaines ou animales sont disponibles, il est possible d'estimer certains paramètres toxicocinétiques à partir de l'ajustement d'un modèle PBPK à ces données. De nombreux auteurs utilisent une méthode d'estimation visuelle, c'est-à-dire plusieurs valeurs sont choisies par les modélisateurs pour le ou les paramètre(s) inconnu(s) et la valeur menant à une concordance satisfaisante entre la cinétique observée et les prédictions du modèle est retenue (Tornerio-Velez *et al.* 2012).

Parallèlement à ces méthodes visuelles, la calibration bayésienne de modèles PBPK à l'aide de données de cinétique rencontre un succès certain depuis une vingtaine d'années (Gelman *et al.* 1996; Hack 2006; Teeguarden *et al.* 2013). Dans un contexte bayésien, toutes les entités inconnues sont considérées comme des variables aléatoires, notamment les paramètres du modèle (noté θ). Avant d'analyser les données expérimentales, une distribution de probabilité *a priori*, P_{θ} , est assignée à chaque paramètre à estimer. Les distributions *a priori* sont ensuite mises à jour avec les nouvelles données expérimentales afin d'obtenir une distribution de probabilité *a posteriori*. Cette mise à jour est réalisée par l'intermédiaire du théorème de Bayes qui stipule que la distribution de probabilité *a posteriori* $P(\theta|y)$ est proportionnelle au produit de toutes les distributions *a priori*, P_{θ} , et de la vraisemblance des données, $P(y|\theta)$ (Equation 7) :

$$P(\theta|y) \propto P_{\theta} \times P(y|\theta) \quad (7)$$

La distribution de probabilité *a posteriori* ainsi obtenue représente la connaissance sur les paramètres, incluant l'information contenue dans les nouvelles données. Trois composantes sont donc essentielles à la mise en œuvre d'une calibration bayésienne : la définition des distributions *a priori* et de la vraisemblance, et l'algorithme de mise à jour. La Figure 16 présente graphiquement le principe de calibration bayésienne d'un modèle PBPK.

Une distribution *a priori* doit traduire les connaissances sur le paramètre avant l'observation des données à analyser. La connaissance *a priori* inclut, par exemple, des données développées *in vitro*, des informations obtenues dans la littérature ou par l'expertise. Un vaste choix de distributions de probabilité est ensuite disponible pour traduire cette connaissance (par exemple, loi uniforme pour une distribution non-informative, ou une loi normale pour une distribution informative). La distribution *a priori* peut donc être interprétée en termes de degré de croyance sur les valeurs possibles du paramètre.

La forme de la vraisemblance, $P(y|\theta)$, dépend d'une part du modèle déterministe (le modèle PBPK dans notre cas), mais aussi du modèle d'erreur sur les données. Dans le cadre d'études de cinétique, ces mesures correspondent souvent à des concentrations dans les biofluides (sang, urine) ou dans les tissus. Il est courant de recourir au modèle log-normal pour décrire l'erreur analytique de telles mesures. Pour définir la variance du terme d'erreur, deux approches sont possibles : soit la variance est constante (Mezzetti *et al.* 2003; Mork *et al.* 2009), soit elle est dépendante de la concentration mesurée et augmente pour les concentrations proches de la limite de quantification de l'appareil de mesure (Brochot and Bois 2005; Wakefield and Racinepoon 1995).

Une fois les distributions *a priori* et la vraisemblance définies, l'expression analytique de la loi *a posteriori* $P(\theta|y)$ pourra être déterminée uniquement dans les cas les plus simples, tels que les

modèles linéaires. Dans les autres cas, il sera possible d'avoir recours aux méthodes de simulations Monte Carlo par Chaînes de Markov (MCMC) pour échantillonner des valeurs de paramètres issus de la distribution *a posteriori* sans connaître l'expression analytique de cette dernière. Plusieurs algorithmes ont été proposés pour construire des chaînes MCMC. Les plus utilisés pour la calibration de modèles PBPK sont l'algorithme de Metropolis-Hastings et l'échantillonnage de Gibbs, pour lequel la connaissance de l'expression analytique des lois de distributions conditionnelles de chaque variable du modèle en fonction des autres variables et des données est requise (Gelman *et al.* 1996; Gilks 2005).

De nombreux logiciels sont disponibles pour résoudre les systèmes d'équations différentielles générés par un modèle PBPK. Ces logiciels peuvent être soit généralistes soit très spécifiques. Le choix du logiciel se fait donc selon le but recherché et, surtout, selon les compétences de l'utilisateur.

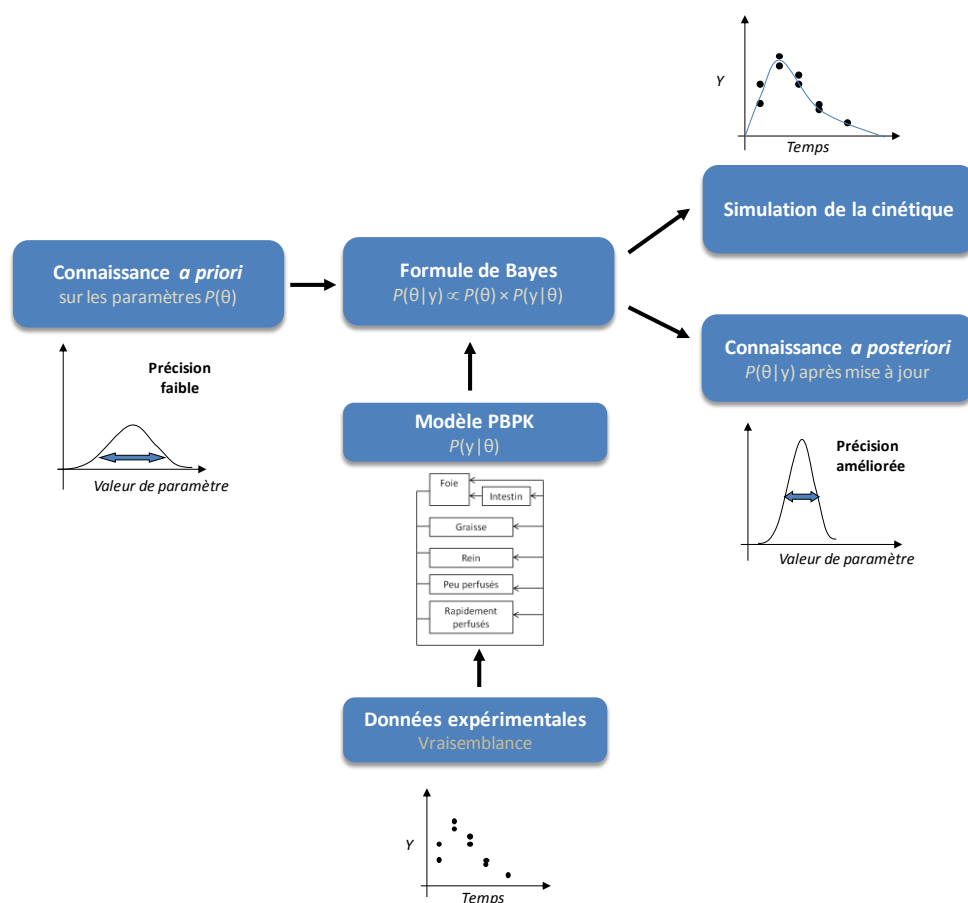


Figure 16. Mise en œuvre de la calibration bayésienne d'un modèle PBPK

II.3.d. Evaluation des modèles PBPK

Le processus d'évaluation doit être une partie intégrante du développement du modèle. L'évaluation passe par la vérification du modèle et, si possible, sa validation. Ces étapes sont nécessaires pour démontrer objectivement la fiabilité et la pertinence du modèle et ainsi permettre son utilisation par d'autres utilisateurs (Chiu *et al.* 2007).

Généralement, au moins un ensemble de données expérimentales est disponible pour vérifier le comportement du modèle. Ces données permettent de s'assurer que le modèle est capable de

reproduire la cinétique de la molécule, par exemple les pics et variations de la concentration. Cependant, l'étape de vérification ne se limite pas à cette confrontation entre les prédictions du modèle et les données mais nécessite aussi de s'assurer de la vraisemblance de la structure du modèle, de sa paramétrisation et de la justesse mathématique des équations (*e.g.* conservation du bilan massique et des flux sanguins) (IPCS 2010). En raison de la description mécanistique des processus ADME, la structure du modèle et les valeurs prises par les paramètres doivent être en accord avec la réalité biologique. Par conséquent, un modèle paramétré avec des valeurs incohérentes au regard des connaissances physiologiques et biologiques ne pourra pas être considéré dans un autre cadre que celui de son développement et nécessitera l'acquisition de nouvelles données afin d'expliquer ces phénomènes inattendus. Quant au processus de validation, ce dernier permet d'explorer les capacités prédictives du modèle PBPK pour différentes conditions expérimentales (dose, voies d'exposition...) et ainsi définir un domaine de validité (Micallef *et al.* 2005).

Dans le cadre des modèles PBPK, les termes vérification et validation sont souvent associés à un objectif prédéfini, à savoir une mesure de dose interne pertinente pour le mode d'action de la substance (par exemple, l'aire sous la courbe ou la concentration maximale dans les tissus cibles). Il est rarement possible de vérifier et valider le modèle dans sa globalité. Ceci nécessiterait un nombre important de données expérimentales, c'est-à-dire pour l'ensemble des variables d'état (évolution temporelle de la concentration dans tous les compartiments) et des paramètres du modèle pour divers scénarios d'exposition. L'acquisition de telles données est inenvisageable en raison des coûts financiers et éthiques qu'elle engendrerait. L'objectif ici reste donc d'établir de la confiance dans les prédictions du modèle pour un nombre restreint de variables en se basant sur des principes scientifiques et sur la qualité des valeurs des paramètres ainsi que sur la capacité du modèle à reproduire des données expérimentales indépendantes.

La validation du modèle peut être complétée par une analyse de sensibilité, consistant à faire varier d'un faible pourcentage la valeur de chaque paramètre. Cette méthode permet d'identifier le paramètre dont une faible variation entraîne un fort impact sur la cinétique globale du composé (Loizou *et al.* 2008).

II.3.e. Utilisation des modèles PBPK dans l'évaluation du risque

Par leur structure les modèles PBPK peuvent être utilisés aux différentes étapes de l'évaluation du risque lié à l'exposition (Clark *et al.* 2004; IPCS 2010; Loizou *et al.* 2008; Meek *et al.* 2013; US EPA 2006).

II.3.e.i. Extrapolation à des conditions réelles d'exposition

Par leur description physiologique de l'organisme et mécanistique des processus ADME, les modèles PBPK fournissent un cadre paramétrique adéquat pour extrapoler les résultats obtenus lors des études en laboratoire à des situations réelles d'exposition pour la population humaine. Les modèles PBPK permettent d'extrapoler le comportement cinétique des molécules entre espèces (animaux de laboratoires aux humains), entre voies d'exposition, de fortes à faibles doses, entre scénarios d'exposition (exposition continue ou aiguë), entre individus (variabilité inter-individuelle), et pour un même individu (variabilité intra-individuelle) (Abduljalil *et al.* 2012; Beaudouin *et al.* 2010; Price *et al.* 2003). Ces simulations se basent sur le principe selon lequel la forme analytique de la cinétique de la

substance dans le corps est identique quel que soit les conditions expérimentales, les espèces ou les individus. Seules les valeurs des paramètres du modèle expliquent les différences observées sur les profils cinétiques. La seule précaution à prendre est de s'assurer que les nouvelles conditions expérimentales appartiennent bien au domaine de validité du modèle. Idéalement, les extrapolations obtenues devraient être validées avec au moins un ensemble de données indépendant.

Les conditions expérimentales lors d'expositions en laboratoire sont souvent éloignées de celles rencontrées au quotidien. La dose, la durée et la fréquence des expositions sont des paramètres du modèle PBPK. Il suffit alors de modifier la valeur de ces paramètres pour prédire le comportement de la substance pour de nouveaux scénarios d'exposition. Ces extrapolations restent cependant délicates en raison de phénomènes de saturation pouvant affecter le métabolisme et l'élimination des composés à des fortes doses (Bailer and Dankovic 1997). Ces saturations engendreront des non-linéarités au niveau de la cinétique qu'il sera nécessaire d'avoir pris en compte lors du développement du modèle PBPK. D'autres phénomènes peuvent aussi engendrer une cinétique non-linéaire, tels que l'induction, l'inactivation ou la déplétion d'enzyme. En plus des extrapolations inter-durée et inter-dose, il est possible de transposer entre voies d'administration (Mielke *et al.* 2011). Une fois dans le corps, la substance se distribue selon les mêmes mécanismes indépendamment de la voie d'administration. Pour extrapoler à une autre voie d'administration, il est nécessaire d'avoir modélisé la nouvelle phase d'absorption afin de quantifier la dose de substance atteignant la circulation systémique. Dans le cas d'expositions par voie orale, le métabolisme de premier passage et la circulation entéro-hépatique devront être modélisés si ces mécanismes résultent en une élimination significative de la substance.

L'extrapolation inter-espèce avec un modèle PBPK se base sur le fait que les mammifères disposent d'une anatomie similaire de part la présence et l'agencement des organes au sein de leur organisme et d'un système circulatoire. Un modèle PBPK développé à partir de données animales est extrapolé à une espèce cible en affectant aux paramètres du modèle des valeurs concernant cette nouvelle espèce (Watanabe and Bois 1996; Welsch *et al.* 1995). Pour les paramètres substance-dépendant tels que les vitesses de métabolisme, l'extrapolation devra intégrer les différences inter-espèces au niveau de leur équipement enzymatique (présence ou pas de certaines enzymes et quantité des enzymes).

Dans le cadre des extrapolations inter-individuelles, une source importante de variation sera l'activité enzymatique due au polymorphisme génétique. La variation intra-individuelle proviendra de l'anatomie et la physiologique du sujet (flux, volume organe). Ces paramètres évoluent au cours de la vie, de l'enfant à la personne âgée en passant par la personne en surpoids ou la femme enceinte. Ces phénomènes peuvent être transcrit sous la forme d'équations afin de pouvoir les intégrer dans un modèle PBPK (Beaudouin *et al.* 2010; Edginton *et al.* 2006; Gentry *et al.* 2003; Luecke *et al.* 1994).

II.3.e.ii. Couplage à des modèles de toxicodynamie

Les modèles dose-réponse traditionnellement utilisés en évaluation du risque lient la survenue d'effets indésirables à la dose administrée. Afin de préciser davantage cette relation, la toxicocinétique du composé peut être intégré à ces modèles. La relation dose-effet classique va être décomposé en relation dose administrée → dose interne efficace → effet. Ainsi va être associés aux effets toxiques observés, une concentration en composé au niveau du site d'action, et non plus une

dose administrée. Le modèle PBPK va relier la dose administrée et la dose interne efficace, et le modèle toxicodynamique, la dose interne efficace à l'apparition des effets (Clewell *et al.* 2002; Meek *et al.* 2013; US EPA 2006). Cette méthodologie simplifie l'extrapolation des effets de l'animal à l'humain. Elle se base sur le cadre paramétrique des modèles PBPK et sur le postulat que la toxicodynamie est indépendante de l'espèce (Louisse *et al.* 2010; Timchalk *et al.* 2002).

II.3.e.iii. Prédiction de l'exposition externe

Reliés avec les études de biosurveillance, les modèles PBPK peuvent être utilisés dans un contexte de dosimétrie inverse, consistant à lier des mesures biologiques individuelles collectées lors de campagnes de biosurveillance à un scénario d'exposition non connu (Clewell *et al.* 2008; Lyons *et al.* 2008). Dans ce contexte, il s'agit d'estimer l'exposition la plus vraisemblable d'un individu ou d'une population à une substance, à partir de concentrations internes (par exemple, dans le sang ou les urines). Le profil toxicocinétique du composé actif (substance parente ou métabolites) dans les tissus cibles à l'aide de modèles PBPK est ensuite simulé. Ceci a pour but de placer les données de biosurveillance dans un schéma classique d'évaluation des risques « exposition → dose au niveau du tissu cible → effets néfastes sur la santé ». La dosimétrie inverse ou reconstruction de dose repose sur trois composantes : les mesures d'imprégnation de la population, le modèle toxicocinétique, et le scénario d'exposition. En effet, les données de biosurveillance attestent de la présence d'une imprégnation de la population mais ne fournissent pas une mesure directe de la dose de la substance au niveau du tissu cible. Utiliser des modèles PBPK permet d'estimer non seulement l'exposition par dosimétrie inverse mais aussi d'estimer des concentrations au niveau de tissus ou organes cibles qui ne peuvent être échantillonnés et ainsi faire le lien avec des effets sur la santé.

II.3.e.iv. Couplage à d'autres modèles PBPK

Selon la problématique de l'étude et le profil cinétique de la molécule, un modèle PBPK peut être couplé à d'autre modèle. Plusieurs modèles PBPK peuvent être couplés dans le cas d'exposition à un mélange de composés. L'objectif sera d'évaluer l'impact du mélange sur la cinétique des composés, en particulier lorsque ceux-ci partagent les mêmes voies métaboliques (Mumtaz *et al.* 2012; Price and Krishnan 2011). Un autre type de couplage peut être réalisé. Le modèle PBPK du composé parent peut être relié au niveau des sites de métabolisme à un modèle décrivant la cinétique du métabolite (Brochot *et al.* 2007; Gill *et al.* 2013; Heredia-Ortiz *et al.* 2011; McMullin *et al.* 2007a). Le modèle du métabolite peut être de type physiologique et décrire l'ensemble des processus ADME. Par exemple, le modèle PBPK du métabolite peut être simplifié à un site de transformation et un compartiment regroupant les autres organes. La cinétique du métabolite peut aussi être représentée de façon empirique. Le modèle contient alors 1 ou 2 compartiments sans notion physiologique où les échanges sont représentés par des constantes de transfert. La vitesse de formation du ou des métabolites peut être estimée individuellement (constantes d'ordre 1 ou 0) (Brochot *et al.* 2007) ou être dépendante de la clairance du composé parent, sous forme de fraction (Tornero-Velez *et al.* 2012). Cette association de modèle permet de préciser la relation composé parent-métabolites. Cette approche est particulièrement intéressante dans le cas de la dosimétrie inverse, permettant l'interprétation des données en biomarqueurs.

II.4. Modèles PBPK publiés sur les pyréthriinoïdes

Les deux seuls pyréthriinoïdes dont la cinétique a été modélisée par des modèles PBPK sont la deltaméthrine et le mélange d'isomères *cis/trans* de la perméthrine. Ces modèles font suite aux expériences *in vivo*. Leur structure reprend les caractéristiques cinétiques des pyréthriinoïdes avec l'inclusion du sang et du foie en tant que sites de métabolisme, le cerveau, organe cible, et les graisses, site de stockage (Figure 17). Par la suite, différentes approches de modélisation ont été suivies pour rendre compte des processus ADME.

II.4.a. Structure des modèles PBPK des pyréthriinoïdes

La voie d'exposition le plus souvent modélisée est la voie orale. Le processus d'absorption est alors décrit par deux compartiments représentant l'estomac et l'intestin. L'absorption a lieu soit au niveau de ces deux sites (Mirfazaelian *et al.* 2006; Tornero-Velez *et al.* 2010) soit uniquement au niveau de l'intestin (Godin *et al.* 2010). Le transfert du composé (absorption stomacale, intestinale et transfert entre estomac et intestin) a été considéré dans un premier temps comme un processus saturable (Mirfazaelian *et al.* 2006). Les derniers modèles le représentent désormais par des constantes de premier ordre.

La distribution dans le sang et les organes a été modélisée de plusieurs façons. Le sang, dans un premier temps assimilé à un compartiment en diffusion limité, a été divisé en deux sous-compartiments distinguant le plasma des globules rouges (Mirfazaelian *et al.* 2006). Les résultats de l'étude indiquant la répartition à 83 % des pyréthriinoïdes dans le plasma a permis par la suite de simplifier la représentation du sang à un seul compartiment (Kim *et al.* 2008). Les graisses, le cerveau et les tissus peu perfusés ont été toujours été assimilés à des compartiments en diffusion limitée. Le foie a souvent été décrit comme un compartiment en flux limité, sauf par Godin *et al.* (2010) qui avait représenté l'ensemble des compartiments du modèle en diffusion limitée (sauf ceux impliqués dans l'absorption).

Le métabolisme était assimilé à un processus saturable avec l'utilisation de la relation de Michaelis-Menten (Mirfazaelian *et al.* 2006), avant d'être représenté ensuite par une clairance *in vivo* (L/h), réduisant ainsi le nombre de paramètres à estimer. Cette simplification suppose qu'à la dose d'exposition choisie le métabolisme ne soit pas saturé. De plus, dans le premier modèle PBPK des pyréthriinoïdes, une distinction au niveau hépatique a été réalisée entre les métabolismes de type oxydatif et hydrolytique (Mirfazaelian *et al.* 2006). Par la suite, ces deux voies métaboliques ont été regroupées en un seul métabolisme hépatique par souci de simplification. Enfin, la cinétique d'un métabolite des pyréthriinoïdes a été une fois modélisée. Un modèle empirique monocompartimental du DCCA était associé à celui PBPK de la perméthrine (Tornero-Velez *et al.* 2012).

L'excrétion des pyréthriinoïdes et du métabolite est toujours modélisée (constante d'ordre 1) pour conserver l'équilibre massique, bien que ces composés n'aient jamais été dosés dans les fèces et les urines lors des études réalisées pour calibrer les modèles.

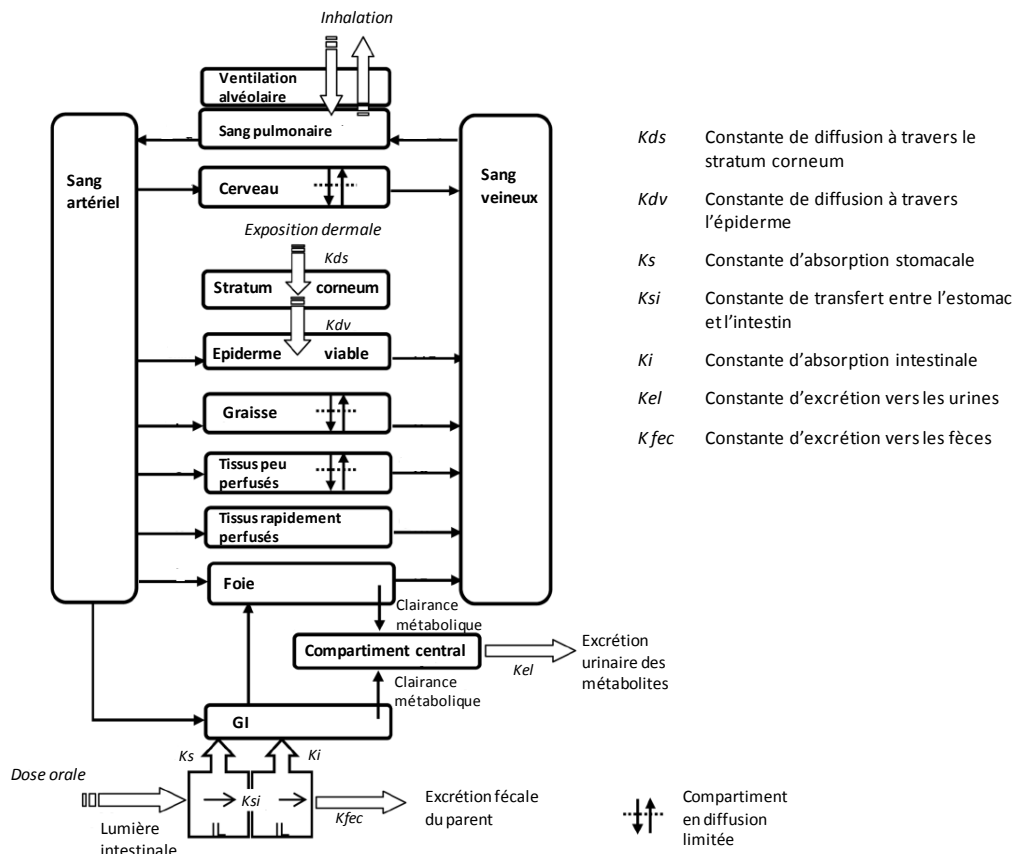


Figure 17. Structure du modèle PBPK de la perméthrine développé par Tornero-Velez *et al.* (2012)

Les valeurs initiales des paramètres (PC , PA , constantes de métabolisme et de transfert) sont déterminées à partir des données de la littérature ou par calcul. En particulier, les valeurs des paramètres métaboliques sont issues de résultats *in vitro* (Anand *et al.* 2006; Godin *et al.* 2007; Godin *et al.* 2006; Scollon *et al.* 2009). Les coefficients de partage ont pu être estimés à l'aide d'algorithmes (Poulin and Theil 2000) ou bien par le ratio d'aire sous la courbe des concentrations tissulaires et sanguines du composé. L'estimation des valeurs des paramètres a ensuite été réalisée par un ajustement visuel des prédictions aux données ou à l'aide d'algorithmes (Nelder-Mead).

Un modèle PBPK à différents âges du rat a aussi été développé pour la deltaméthrine, tenant compte de l'augmentation de la taille des organes et de la variation des constantes de métabolisme selon l'âge (Lopez *et al.* 2000) pour évaluer la variation de l'exposition au cours de la vie (Tornero-Velez *et al.* 2010).

A la suite de l'élaboration des modèles PBPK des pyréthrinoïdes chez le rat, des analyses de sensibilité ont réalisées. Une faible variation de la valeur du coefficient de partage du foie et du cerveau, des vitesses de métabolisme hépatique et des constantes d'absorption (intestinale et transfert estomac-intestin) et d'excrétion avait un impact sur la valeur prédite pour le pic de concentration en deltaméthrine dans le sang et le cerveau (Mirfazaelian *et al.* 2006). La justesse de la valeur de ces paramètres dans l'élaboration d'un futur modèle PBPK d'un pyréthrinoïde est donc importante pour prédire un profil cinétique précis.

Les modèles PBPK de la deltaméthrine et de la perméthrine développés chez le rat ont été par la suite extrapolés à l'homme (Godin *et al.* 2010; Tornero-Velez *et al.* 2012). La structure du modèle

reste identique, à l'exception du métabolisme sanguin qui est supprimé car absent chez l'homme. Les valeurs des paramètres physiologiques (flux, volume des organes) ont été adaptées à la nouvelle espèce (Brown *et al.* 1997) et les données de métabolisme ont été le plus souvent extraites de la littérature (Anand *et al.* 2006; Knaak *et al.* 2012; Scollon *et al.* 2009). De nouveaux sites d'absorption (cutanée et pulmonaire) ont parfois été intégrés (Tornero-Velez *et al.* 2012), même si les valeurs des paramètres liés à ces sites d'exposition n'ont pas été déterminées.

II.4.b. Validation des modèles PBPK des pyréthrinoïdes chez l'homme

La validation des modèles PBPK développés pour les pyréthrinoïdes a consisté à retrouver, par le biais de simulations, la cinétique sanguine du composé parent et/ou les concentrations urinaires en DCCA. Les données de cinétique déjà existantes chez l'homme ont été obtenues suite à une exposition volontaire (Flannigan *et al.* 1985; Nassif *et al.* 1980; Tomalik-Scharte *et al.* 2005; Woolen *et al.* 1992) ou à une intoxication (Gotoh *et al.* 1998) (Tableau 8). La perméthrine et la cyperméthrine sont les molécules les plus étudiées, lors d'une exposition cutanée ou orale. Le métabolite le plus souvent recherché au niveau urinaire est le DCCA. Cependant, même si les cinétiques des pyréthrinoïdes sont rares chez l'homme, les données faisant suite à exposition volontaire (application, ingestion) sont à préférer à celles obtenues dans le cas d'intoxication. En effet, dans cette situation, la cinétique mesurée n'est pas forcément représentative de la cinétique basale de la substance chimique. L'équilibre des masses peut être perturbé (perte due au vomissement) et les vitesses de métabolisme atteindre un ordre 0 (surdosage).

Le modèle PBPK de la perméthrine extrapolé à l'homme a été utilisé pour estimer les concentrations en biomarqueurs urinaires suite à une exposition à la perméthrine, via différents scénarios.

La première étude a consisté à simuler des profils cinétiques urinaires en DCCA en couplant le modèle PBPK à un modèle d'exposition. Le modèle « exposition humaine stochastique et de simulation de dose » (SHEDS pour Stochastic Human Exposure and Dose Simulation) a été utilisé. Ce modèle, développé par l'US EPA, permet de quantifier l'exposition à de nombreuses substances chimiques, en tenant compte de la voie et de la fréquence d'exposition et des caractéristiques démographiques. Ensuite, les cinétiques estimées en DCCA ont été comparées à celles obtenues sur les populations de l'étude NHANES (Tornero-Velez *et al.* 2012).

Tableau 8. Etudes *in vivo* d'exposition à différents pyréthrinoïdes menées chez l'homme

Références	Nature de l'exposition	Molécule administrée	Site d'administration	Données obtenues
Gotoh <i>et al.</i> (1998)	Intoxication	Perméthrine	Orale	Sanguines (Perméthrine)
Eadsforth and Baldwin (1983)	Volontaire	Cyperméthrine	Orale	Urinaires (DCCA)
Nassif <i>et al.</i> (1980)	Volontaire	Perméthrine	Cutanée	Urinaires (DCCA)
Tomalik-Scharte <i>et al.</i> (2005)	Volontaire	Perméthrine	Cutanée	Urinaires (DCCA)
Woolen <i>et al.</i> (1992)	Volontaire	Cyperméthrine	Cutanée Orale	Urinaires (DCCA, 3-PBA, 4'-OH-PBA)

La deuxième étude avait pour objectif l'estimation des profils urinaires chez le personnel aérien lors des séances de désinsectisation dans les avions (Wei *et al.* 2013). Plusieurs scénarii d'exposition ont été réalisés, tenant compte des habitudes de désinsectisation. Des distributions ont été attribuées aux concentrations d'exposition, pour obtenir, par des simulations de Monte-Carlo, un intervalle de confiance sur les concentrations urinaires en 3-PBA. Ces résultats ont pu être confrontés aux concentrations en 3-PBA obtenues chez le personnel aérien. Cette étude a permis de caractériser la source prédominante de l'exposition (cutanée ou orale) à la perméthrine selon le scénario associé, ainsi que l'exposition tissulaire en perméthrine dans le tissu cible (cerveau).

En parallèle des modèles PBPK, des modèles non paramétriques ont relié le composé parent aux métabolites, dans un contexte de mélange (Côté *et al.* 2014; Fortin *et al.* 2008b). Malgré une description complète de la cinétique de la perméthrine, ce modèle est basé sur des constantes de transfert sans signification physiologique, limitant les possibilités d'extrapolation par la suite.

III. Extrapolation inter-espèce du métabolisme *in vitro*

III.1. Méthodes de génération et d'analyse des données de métabolisme *in vitro*

Dans le cadre d'une utilisation future dans des modèles PBPK, les données *in vitro* à générer correspondent le plus souvent à la quantification de la vitesse de disparition du parent ou de formation du métabolite, et non à l'identification des enzymes impliquées dans le métabolisme.

III.1.a. Principe des études *in vitro* de quantification du métabolisme

III.1.a.i. Substances séparées

La quantification du métabolisme d'une molécule peut être abordée via deux approches expérimentales.

La première consiste à déterminer les valeurs des paramètres du couple (V_{max} , K_m) de la relation de Michaelis-Menten (Equation 8), où V représente la vitesse de la réaction et C la concentration en substrat. En effet, une cinétique michaelienne est classiquement envisagée pour le métabolisme, bien que d'autres modèles puissent exister (Houston and Kenworthy 2000).

$$V = \frac{V_{max} \times C}{K_m + C} \quad (8)$$

Cette relation est d'abord linéaire (ordre 1) lorsque la concentration en substrat est faible. La réaction devient ensuite saturée à fortes concentrations (ordre 0), provoquant une quantité de produit formé constante. Lorsque la concentration d'incubation est inférieure à 10 % de la valeur du K_m , la relation pourra ainsi se simplifier de la façon suivante (Equation 9), où CL_{int} correspond à la clairance intrinsèque du composé, soit au ratio V_{max}/K_m :

$$V = CL_{int} \times C \quad (9)$$

Plusieurs facteurs expérimentaux doivent être optimisés avant de réaliser l'expérience pour la détermination des valeurs de ces paramètres. Dans un premier temps, la quantité d'enzymes nécessaire à la réalisation de la réaction doit être évaluée : celle-ci doit être suffisante pour que le métabolisme du composé ait lieu, sans être instantané. De plus, le temps d'arrêt de la cinétique à chaque concentration d'incubation doit être défini. Celui-ci doit permettre d'obtenir une valeur de vitesse de réaction en zone linéaire, c'est-à-dire au début de la cinétique. Après avoir optimisé les conditions expérimentales, l'expérience pour la détermination des paramètres V_{max} et K_m consistera en l'incubation de concentrations croissantes en substrat. La valeur du paramètre V_{max} sera déterminée lorsque la réaction aura atteint saturation. Le paramètre K_m est ensuite défini comme la concentration à laquelle la vitesse de la réaction est égale à la moitié de la valeur de la V_{max} (Figure 18).

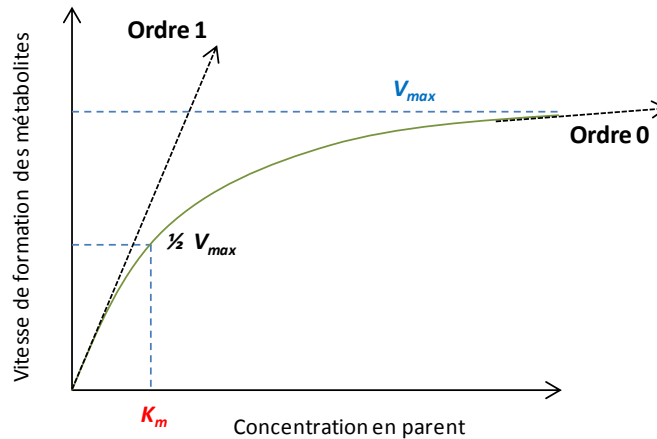


Figure 18. Représentation de la cinétique de Michaelis-Menten exprimant la vitesse de formation du métabolite en fonction des concentrations d'incubation

La deuxième approche envisageable pour quantifier le métabolisme est de caractériser la vitesse de la réaction avec une seule concentration d'incubation. La vitesse doit être linéaire avec la concentration en substrat, cette dernière étant souvent inférieure à 10 % de la valeur du K_m . En effet, dans le cas où des données de métabolisme ont déjà été publiées sur la molécule, une nouvelle détermination des paramètres (V_{max} , K_m) n'est pas toujours nécessaire. La population reste exposée au niveau aigu à des concentrations faibles en polluants environnementaux, et donc inférieures au K_m . Avec cette approche, une cinétique complète de la molécule doit être obtenue. La clairance intrinsèque correspond théoriquement au ratio des valeurs du couple (V_{max} , K_m) (Lipscomb and Poet 2008; Yoon *et al.* 2012).

III.1.a.ii. Co-incubation

Dans un contexte de mélange, l'effet de la co-incubation sur la cinétique respective de chaque composé devra être en plus évalué. Classiquement, si les deux composés sont supposés partager le même chemin métabolique, la première étape consiste à identifier la présence ou non d'une interaction entre les deux composés. L'interaction est le plus souvent de type inhibiteur ou inducteur.

Dans le cas d'une inhibition, la concentration en substrat 1 responsable de 50 % de l'inhibition maximale (IC_{50}) du métabolisme du composé 2 sera déterminée (Lee and Kim 2011). Si une interaction a lieu, alors son intensité et sa nature seront caractérisées par la valeur de la constante d'inhibition, K_i . Le paramètre K_i rend compte de l'affinité d'un inhibiteur pour une enzyme. L'affinité pour l'enzyme est d'autant plus grande que la valeur du K_i est faible. Les inhibitions peuvent être de différentes natures :

- **Inhibition compétitive** : l'inhibiteur compétitif possède une ressemblance structurale avec le substrat. Les deux composés vont se fixer sur le même site enzymatique. L'inhibition peut être levée en augmentant la concentration en substrat.
- **Inhibition incompétitive** : l'inhibiteur incompétitif va se fixer sur le complexe enzyme-substrat. La formation du complexe provoque une modification de la conformation de l'enzyme permettant alors à l'inhibiteur de se fixer. L'inhibiteur va ensuite modifier à son tour la conformation du complexe, empêchant la réaction enzyme-substrat d'avoir lieu. L'inhibition ne peut être levée en augmentant la concentration en substrat.

- **Inhibition non compétitive** : l'inhibiteur non compétitif peut se lier avec la même affinité à la fois sur l'enzyme libre et le complexe enzyme-substrat. L'inhibition ne peut être levée en augmentant la concentration en substrat.
- **Inhibition mixte** : ce sont les mêmes réactions que pour l'inhibition non compétitive, mais cette fois-ci l'affinité de l'inhibiteur pour l'enzyme et le complexe enzyme-substrat peut être différente.
- **Inhibition suicide** : l'inhibiteur va former un complexe stable avec l'enzyme. Ce complexe va inactiver l'enzyme de façon permanente. L'enzyme reconnaît l'inhibiteur comme son substrat et va entamer les premières modifications de ce dernier. Au cours de cette étape, l'inhibiteur modifié devient très réactif et se lie de façon très stable à l'enzyme.

Au niveau expérimental, la valeur du paramètre $IC50$ du composé 1 sera déterminée en co-incubant une seule concentration en composé 2, égale à 10 % de la valeur de son K_m , avec des concentrations croissantes en composé 1. La valeur du paramètre K_i , quant à elle, est définie lors d'expériences similaires à celles réalisées pour déterminer les valeurs des paramètres (V_{max} , K_m). Le composé 2 (substrat) sera incubé à des concentrations croissantes avec une concentration constante en composé 1 (inhibiteur) équivalant à valeur de $1/IC50$ (Brown *et al.* 2008). Une interaction pouvant parfois entraîner une modification des valeurs de V_{max} et K_m (Tableau 9), les paramètres sont alors dénommés V_{max} et K_m apparents.

Dans le cas d'une induction, le composé 1 (respectivement 2) va entraîner une augmentation de la synthèse des enzymes impliquées dans le métabolisme du composé 2 (respectivement 1). Le processus d'induction est long par comparaison avec l'inhibition, s'observant après plusieurs heures d'incubation. L'inducteur peut entraîner via les récepteurs nucléaires CAR et PXR par exemple, l'activation transcriptionnelle des gènes codant pour les enzymes de métabolisme.

Tableau 9. V_{max} et K_m apparents obtenus lors d'une inhibition compétitive, incompétitive, non compétitive et mixte

Type d'inhibition	K_m apparent	V_{max} apparent
Compétitive	$K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$	V_{max}
Incompétitive	$\frac{K_m}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$	$\frac{V_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$
Non compétitive	K_m	$\frac{V_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$
Mixte	$\frac{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$	$\frac{V_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$

III.1.b. Choix expérimentaux pour améliorer l'extrapolation *in vitro-in vivo*

Les valeurs des paramètres de métabolisme doivent être générées dans des conditions optimales pour une utilisation ultérieure dans un contexte d'IVIVE. Pour cela, plusieurs éléments sont à évaluer et à quantifier lors de la réalisation des expériences, pour s'assurer de la bonne qualité des données.

III.1.b.i. Choix du matériel cellulaire

Plusieurs supports cellulaires peuvent être obtenus à partir d'un foie (Figure 19). Le choix du matériel cellulaire utilisé dépend de la nature et de la localisation des enzymes impliquées dans le métabolisme. Les caractéristiques du support cellulaire diffèrent selon que l'étude consiste à comprendre les voies métaboliques de la molécule ou bien à les quantifier. Dans le cadre d'une IVIVE du métabolisme, les valeurs des paramètres obtenues à la fin de l'expérience doivent refléter le métabolisme de manière complète et réaliste physiologiquement.

Plusieurs articles ont recensés les différents systèmes cellulaires disponibles qui sont plus ou moins complexes (Blaauboer 2010; Hewitt *et al.* 2007; Lipscomb and Poet 2008; Pelkonen and Turpeinen 2007; Yoon *et al.* 2012). Les caractéristiques de chaque support sont détaillées ci-dessous et résumées dans le Tableau 10 :

- **les tranches de foie** : ce support a l'avantage de conserver l'architecture de l'organe, de maintenir les fonctions physiologiques ainsi que les activités enzymatiques et de transport. Néanmoins, l'utilisation de ce support entraîne un manque de flexibilité lors de la réalisation de l'expérience car la tranche doit être utilisée rapidement après l'isolement du foie.
- **les cellules recombinantes**, surexprimant une enzyme d'intérêt : elles sont davantage utilisées pour caractériser l'enzyme impliquée dans le métabolisme du composé. Malgré l'application de facteurs correctifs à la valeur de clairance obtenue, le métabolisme est un processus faisant souvent intervenir plusieurs enzymes.
- **les fractions subcellulaires** (microsomes, cytosol) : très souvent utilisées, elles ont l'avantage d'être faciles à préparer, peu onéreuses et stables dans le temps. Différents chemins de métabolisme (oxydation, hydrolyse) peuvent être étudiés, en faisant varier la quantité de cofacteurs (NADPH par exemple). Cependant, ces supports regroupant soit les enzymes de Phase I (microsomes), soit les enzymes de Phase II (cytosol), deviennent limités quand le métabolisme du composé est multi-étapes. De plus, ils n'intègrent pas le processus de liaison du composé à la membrane. Ces manques de réalité physiologique peuvent parfois entraîner une sous-prédiction de la clairance *in vivo* (Brown *et al.* 2007).
- **les hépatocytes** : la structure cellulaire est intacte. Les deux fractions cellulaires (cytosol et microsomes) et les cofacteurs sont présents. La liaison du composé à la membrane est prise en compte. Il existe plusieurs natures d'hépatocytes comme les hépatocytes primaires, les HepaRG et les HepG2. Les hépatocytes primaires sont issus directement du foie du donneur. Ils prennent en compte la variabilité inter-individuelle par le regroupement de lots d'hépatocytes provenant de donneurs différents. Les hépatocytes primaires utilisés peuvent être cryopréservés ou frais puisque leurs activités et leur stabilité sont similaires avec ces deux préparations (McGinnity *et al.* 2004). Cependant, les échanges du composé parent ou du métabolite avec le milieu extracellulaire (transports actifs ou passifs) ne sont pas

totalement représentés. L'utilisation d'hépatocytes est onéreuse mais demeure accessible. Les cellules HepaRG sont une lignée cellulaire provenant d'un hépatocarcinome humain (Guillouzo *et al.* 2007; Marion *et al.* 2010). Elles n'expriment pas de variabilité inter-individuelle. Venant d'une lignée cancéreuse, sa disponibilité est toujours assurée. La lignée possède peu de variabilité dans les activités fonctionnelles. Ces cellules sont plus souvent utilisées pour les études d'interaction. Les cellules HepG2, issues aussi d'une lignée cancéreuse, présentent l'avantage d'avoir une polarité conservée.

Dans le cadre de l'IVIVE du métabolisme, les hépatocytes primaires se présentent comme le support le plus adapté pour quantifier le métabolisme.

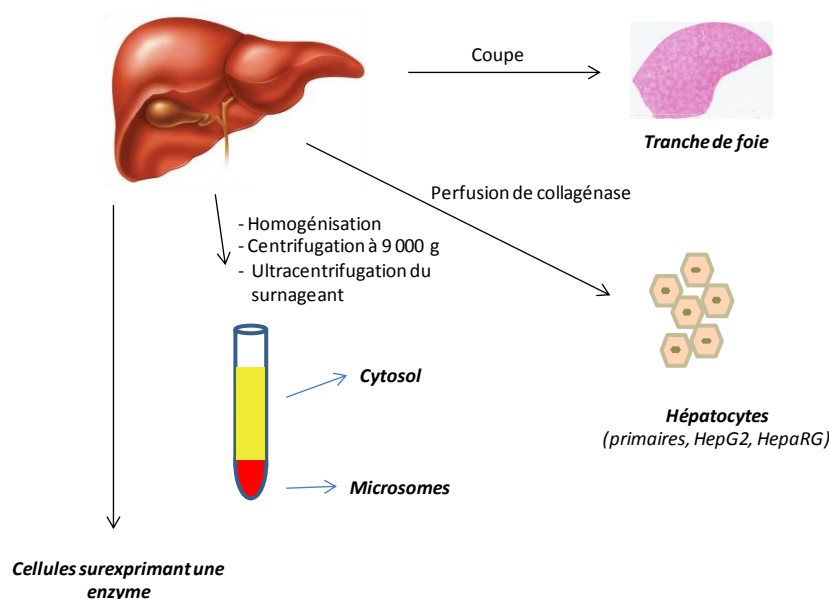


Figure 19. Différents supports cellulaires pouvant être obtenus à partir d'un foie

Tableau 10. Caractéristiques des systèmes *in vitro* hépatiques utilisés dans les études de métabolisme (adapté de Lipscomb *et al.* (2008) et Yoon *et al.* (2012))

Systèmes <i>in vitro</i>	Enzymes et autres
Tranche d'organe	Enzymes microsomaux et cytosoliques, structure cellulaire conservée
Enzyme surexprimée	Enzyme d'intérêt (rCYPs, rUGTs), niveau de protéine et de lipide physiologique non conservé
Microsomes	Enzymes de Phase I: CYPs, FMO, estérases, GSH S-transférases, UGTs
Cytosol	Enzymes de Phase II : sulfotransférases, N-acétyltransférases, amino acide conjuguases, GSH S-transférase, glucuronidases
Hépatocytes	Enzymes microsomaux et cytosoliques, liaison membranaire prise en compte

r : recombinant ; **UGT** : glucuronosyltransférase ; **FMO** : mono oxygénase à flavine ; **GSH** : glutathion

III.1.b.ii. Evaluation des liaisons aspécifiques

La concentration nominale (concentration théorique présente dans milieu) en composé est très souvent éloignée de la concentration totale (milieu + cellule) mesurée analytiquement (Groothuis *et al.* 2013). Or la cinétique du composé est dépendante de la concentration réellement disponible pour l'enzyme. Seul le composé libre peut traverser les membranes et être métabolisé. Pour estimer une

vitesse de disparition ou d'apparition pertinente, il est nécessaire d'évaluer et quantifier les facteurs modifiant la concentration en composé parent ou en métabolite (Figure 20) (Lipscomb and Poet 2008; Pelkonen and Turpeinen 2007; Yoon *et al.* 2012):

- **la liaison au support d'étude** : les tubes de préparation, les cônes de prélèvement ou les puits dans lesquels sont incubées les molécules sont des sources potentielles d'adsorption. Les molécules concernées par l'adsorption sont majoritairement lipophiles. Elles auront tendance à fuir le milieu aqueux dans lequel elles sont maintenues avec les cellules. Il est donc nécessaire de quantifier la fraction de molécules adsorbées (Palmgrén *et al.* 2006) et d'opter pour un matériel limitant ce phénomène (Fukazawa *et al.* 2010).
- **l'évaporation** du composé dans l'étuve : cela concerne les molécules volatiles. La quantification de ce phénomène évitera d'assimiler la totalité de la disparition du composé dans le puits à du métabolisme (Groothuis *et al.* 2013).
- **la liaison aux protéines** : la molécule présente dans le puits peut se lier à des protéines de différentes natures : lipides, protéines membranaires ou sérum. La microdialyse ou l'ultracentrifugation sont des outils capables de déterminer la valeur de la fraction non liée aux protéines. Dans le cadre de l'extrapolation *in vitro-in vivo*, il est préférable de reproduire au mieux les conditions *in vivo*, par l'ajout de protéines plasmatiques au milieu d'incubation. Les liaisons entre les molécules et les protéines du sérum sont plus fortes que celles envers le plastique. La présence de sérum permet de créer ainsi dans le puits un équilibre entre les liaisons pour les molécules (Blanchard *et al.* 2004; Kramer *et al.* 2012; Li 2007).

La détermination de la concentration disponible est de plus en plus souvent effectuée pour associer une concentration précise à une cinétique, ou à un effet lors des tests de toxicité. Le phénomène d'adsorption (Kramer *et al.* 2012; Ouattara *et al.* 2011) et la liaison de la molécule aux protéines (Baker and Parton 2007) peuvent être aussi modélisés, par des constantes de premier ordre. L'objectif est de minimiser l'incertitude sur les valeurs des concentrations disponibles pour le métabolisme.

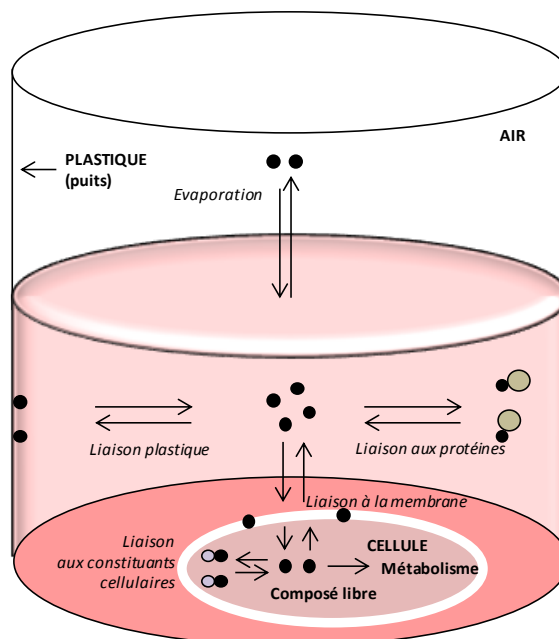


Figure 20. Représentation schématique des différents processus déterminant la disponibilité du composé dans le puits (adapté de Kramer *et al.* (2012) et Pelkonen *et al.* (2007))

III.1.b.iii. Caractérisation de l'activité du lot

Dans le cadre de la quantification du métabolisme d'un nouveau composé, une étape indispensable avant le début de toute expérimentation est l'évaluation de l'activité enzymatique du support d'étude. Les enzymes impliquées dans le métabolisme du composé doivent être auparavant identifiées. Ainsi, certains substrats, dont la transformation est spécifique d'une seule enzyme, sont utilisés pour caractériser l'activité de l'enzyme (Tableau 11) (US FDA 2011; Yuan *et al.* 2002). La caractérisation de l'activité de l'enzyme permet de qualifier le niveau d'activité du lot. Elle facilite aussi l'interprétation et la mise en perspective de la valeur de clairance *in vitro* intrinsèque obtenue pour le composé étudié.

Tableau 11. Réactions utilisées pour caractériser l'activité d'une enzyme, basé sur Yuan *et al.* (2002)

Enzyme	Nature de la réaction sur le substrat spécifique de l'enzyme
CYP1A1	Ethoxyrésorufine <i>O</i> -déthylation
CYP1A2	Phénacétine <i>O</i> -déthylation
CYP2A6	Coumarine 7-hydroxylation
CYP2B6	7-éthoxy-4-trifluorométhyle coumarine <i>O</i> -déalkylation
CYP2C9	Tolbutamide 4-hydroxylation S-warfarine 7-hydroxylation Diclofénac 4-hydroxylation
CYP2C19	S-méphénytoïne 4'-hydroxylation
CYP2D6	Dextrométhorphan <i>O</i> -déméthylation Bufuralol 1-hydroxylation
CYP2E1	Chlorzoxazone 6-hydroxylation
CYP3A4/5	Testostérone 6-hydroxylation Hydroxylation des benzodiazépines (midazolam, triazolam, alprazolam)

III.1.c. Méthodes pour l'amélioration de l'analyse des données *in vitro*

L'estimation des valeurs des paramètres V_{max} et K_m régissant la vitesse de réaction à long temps été réalisée avec des méthodes plus ou moins graphiques (Hacker *et al.* 2009). Parmi ces méthodes, les plus connues sont les méthodes de Lineweaver-Burke et d'Eisenthal & Cornish-Bowden. La première, méthode graphique, consiste à représenter l'inverse des vitesses de formation en fonction de l'inverse des concentrations d'incubation. Ces différentes transformations ont l'inconvénient de propager l'incertitude existant sur les concentrations mesurées et d'augmenter ainsi celle sur les valeurs des paramètres V_{max} et K_m . La méthode d'Eisenthal & Cornish-Bowden, considérée comme non graphique, n'implique pas la transformation des données (Eisenthal and Cornish-Bowden 1974). Les vitesses de formation sont représentées en fonction des concentrations d'incubation en composé exprimées négativement. L'intersection des droites, idéalement en un point, correspond aux valeurs de V_{max} et K_m (Figure 21).

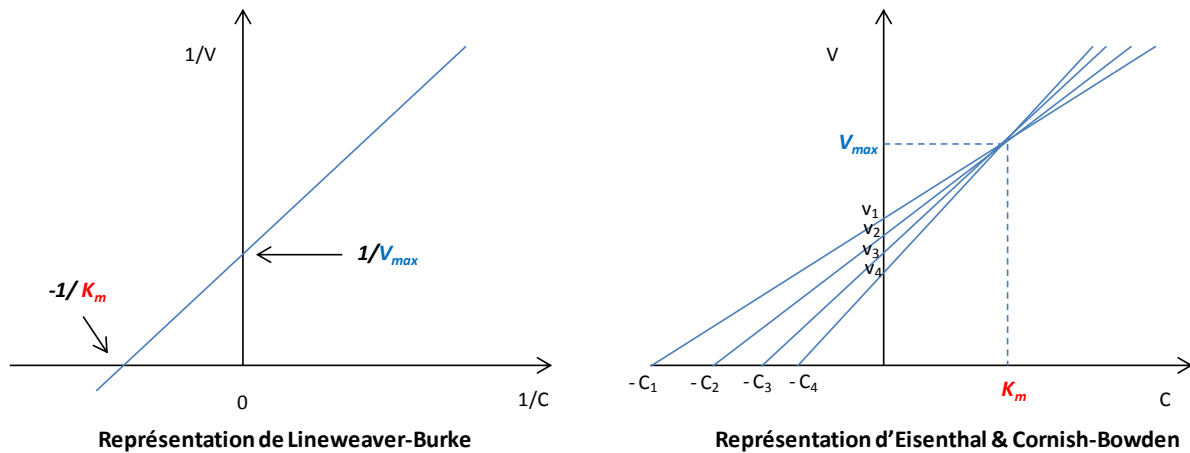


Figure 21. Exemples de représentation graphique pour la détermination des valeurs des paramètres V_{max} et K_m

Suite au développement des calculateurs, il est fortement recommandé d'analyser les données en les modélisant. Lors de la modélisation de l'équation de Michaelis-Menten, l'estimation des valeurs des paramètres (V_{max} , K_m) est alors effectuée par régression linéaire. L'ajustement peut être réalisé par différentes approches. La méthode des moindres carrés, souvent utilisée dans les logiciels d'enzymologie (GraphPad Prism), est très sensible aux points de données. Une grande incertitude sur la valeur des paramètres estimés peut donc avoir lieu. Le recours aux méthodes bayésiennes présente l'avantage d'analyser simultanément l'ensemble des données générées selon différents plans d'expérience pour un même composé.

Lorsque la concentration d'incubation est largement inférieure à la valeur du K_m , l'estimation de la clairance intrinsèque peut être réalisée par la transformation de la valeur de la demi-vie d'élimination. Celle-ci est alors obtenue par la régression linéaire des concentrations restantes en parent en fonction du temps (Obach 1999). Néanmoins, le recours à la calibration bayésienne demeure préférable.

La valeur du paramètre de clairance intrinsèque *in vitro* peut aussi être déterminée par la modélisation dynamique et mécanistique de l'évolution du composé au sein de la cellule. L'approche peut être empirique ou physiologique. Le métabolisme et les échanges entre les milieux intra et extracellulaires via les transporteurs au sein d'un hépatocyte ont été modélisés pour mieux comprendre leur impact sur la clairance hépatocytaire du composé (Paine *et al.* 2008; Poirier *et al.* 2009). Les modèles regroupent la description des concentrations dans la cellule et au niveau de la membrane d'une part et celle des concentrations extracellulaires (milieu) d'autre part. Ainsi, les vitesses de métabolisme, mais aussi d'échanges (actifs ou passifs) à travers la membrane, peuvent être estimées.

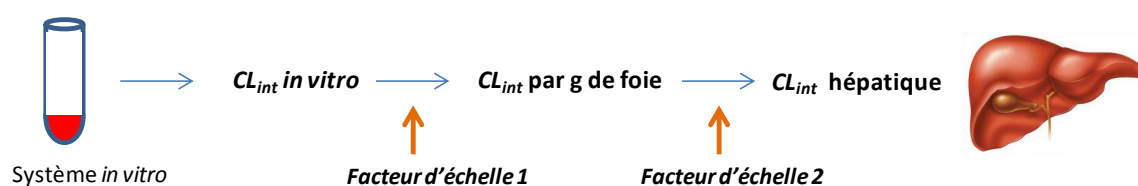
La transformation du composé parent en métabolite peut aussi être modélisée (Li *et al.* 2012; Mazur *et al.* 2007). Cette approche reste encore peu décrite dans la littérature car les études *in vitro* consistent le plus souvent à étudier soit la disparition du parent, soit l'apparition du métabolite. Pourtant, la modélisation de ces données permet de déterminer simultanément les vitesses de disparition du composé parent et celles d'apparition des métabolites de manière indépendante et de mettre en valeur des phénomènes tels que les interactions (McMullin *et al.* 2007b).

III.2. Conditions d'extrapolation des données *in vitro*

Une fois les valeurs des paramètres de métabolisme estimées, plusieurs éléments sont à prendre en compte pour utiliser la valeur *in vitro* de clairance intrinsèque en tant que valeur initiale de la clairance *in vivo* intrinsèque dans le modèle PBPK (Houston 1994b; Lavé *et al.* 1999). Des facteurs d'extrapolation doivent d'abord être appliqués à la valeur de clairance déterminée *in vitro* (Figure 22). L'extrapolation *in vitro-in vivo* part du postulat que la vitesse globale de la réaction enzymatique est directement proportionnelle à la quantité d'enzymes présentes. La clairance *in vitro* estimée est alors corrigée, selon le support d'étude, par le nombre de cellules, de microsomes ou d'enzymes surexprimées par gramme de foie, puis ensuite par le poids du foie par kilogramme du poids du corps (pc). Les valeurs de ces facteurs correctifs sont dépendantes de l'espèce étudiée (Tableau 12). De nombreuses études dans la littérature ont mesuré ces paramètres physiologiques chez le rat et l'homme. En compilant tous les résultats, Barter *et al.* (2007) a établi une moyenne de 99×10^6 hépatocytes par gramme de foie humain, avec un intervalle de confiance à 95 % allant de 74 à 131×10^6 hépatocytes par gramme de foie.

Une correction de la valeur de la clairance intrinsèque estimée *in vivo* par la valeur de la fraction liée aux protéines est envisageable. L'estimation de la clairance hépatique *in vivo* est ainsi parfois améliorée, selon les propriétés physico-chimiques de la molécule (Obach 1999; Riley *et al.* 2005). Cependant, la présence de sérum dans le milieu d'incubation s'avère parfois suffisante à l'obtention d'une valeur de clairance intrinsèque *in vivo* représentative de celle hépatique (Blanchard *et al.* 2004).

Lors de l'extrapolation des valeurs des paramètres (V_{max} et K_m), alors que la valeur *in vitro* du paramètre V_{max} peut être extrapolée directement, la valeur du paramètre K_m est éventuellement corrigée. Les paramètres (adsorption, fraction liée) décrits précédemment sont alors appliqués, selon l'intensité de ces phénomènes. Lors de l'intégration des valeurs de ces paramètres au sein d'un modèle PBPK, une correction par le coefficient de partage foie : sang (molécules lipophiles en particulier) a aussi été proposée (Mazur *et al.* 2007).



Systèmes <i>in vitro</i>	CL_{int} <i>in vitro</i>	Facteur d'échelle 1	Facteur d'échelle 2
Microsome	$\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ prot microsomales	\times nombre de prot microsomales / g de foie (MPPGL)	\times Poids du foie (g de foie/ kg pc)
Hépatocytes	$\mu\text{L}/\text{min}/10^6$ cellules	\times nombre d'hépatocytes / g de foie (HPGL)	\times Poids du foie (g de foie/ kg pc)
Cellules surexprimant un isoforme de CYP	$\mu\text{L}/\text{min}/\text{pmol}$ de CYP surexprimé	\times (pmol CYP surexprimé / mg prot microsomales) \times MPPGL	\times Poids du foie (g de foie/ kg pc)

prot : protéines

Figure 22. Facteurs d'échelle à appliquer à la CL_{int} *in vitro* pour obtenir la CL_{int} *in vivo* hépatique

Une fois déterminée, la valeur de CL_{int} *in vivo* hépatique peut être corrigée par l'activité spécifique mesurée des enzymes. Une valeur de clairance intrinsèque *in vitro* indépendante de l'activité du support d'étude sera ainsi obtenue (Lipscomb and Kedderis 2002). Cette correction est intéressante pour l'extrapolation de la clairance dans des sous-populations connues pour avoir une activité enzymatique différente (ethnie, âge...).

Tableau 12. Valeurs de référence pour l'extrapolation *in vitro-in vivo* chez le rat et l'homme (Lipscomb and Poet 2008)

Paramètres	Valeurs de paramètre	Facteurs d'échelle	Références
Rat			
Poids du corps	0,25 kg		Houston (1994b)
Poids du foie	4,5 g/kg pc	11 g	
Flux sanguin hépatique	1,8 mL/min/g foie	20 mL/min	
Nombre d'hépatocytes	$1,35 \times 10^8$ cellules/g foie	$1,5 \times 10^9$ cellules	
Taux de protéines	45 mg/g de foie	500 mg	
Homme			
Poids du corps	70 kg		
Poids du foie	2,6 g/kg pc	1 820 g	
Flux sanguin hépatique	0,71 mL/min/g foie	1 292 mL/min	Brown <i>et al.</i> (1997)
Nombre d'hépatocytes	99×10^6 cellules/g foie	$1,8 \times 10^{11}$ cellules	Barter <i>et al.</i> (2007)
Taux de protéines	34 mg/g de foie	61 880 mg	Barter <i>et al.</i> (2007)

III.3. Données *in vitro* sur les pyréthrinoïdes

Les nombreuses études *in vitro* sur les pyréthrinoïdes (deltaméthrine, perméthrine) ont permis de caractériser et de quantifier leur métabolisme chez le rat et l'homme. Les données quantitatives sur le métabolisme de la deltaméthrine ne seront pas présentées ici (Anand *et al.* 2006; Godin *et al.* 2007; Godin *et al.* 2006) pour ne s'intéresser qu'aux résultats relatifs à la perméthrine. Le métabolisme de la perméthrine chez le rat et l'homme a été étudié sur cellules recombinantes (Lavado *et al.* 2014; Nakamura *et al.* 2007; Nishi *et al.* 2006; Yang *et al.* 2009), microsomes et cytosols (Crow *et al.* 2007; Lavado *et al.* 2014; Ross *et al.* 2006; Scollon *et al.* 2009; Tange *et al.* 2014) et autres fractions cellulaires purifiées (Choi *et al.* 2002).

III.3.a. Identification des voies métaboliques des pyréthrinoïdes

Les études *in vitro* de métabolisme sur les pyréthrinoïdes ont permis de préciser les connaissances obtenues lors des expérimentations de cinétique *in vivo*. Les chemins métaboliques empruntés par les pyréthrinoïdes ainsi que les enzymes impliquées ont pu être identifiés chez le rat comme chez l'homme. Les pyréthrinoïdes peuvent être soit hydrolysés (processus rapide) soit oxydés (processus lent). Dans le cas de la perméthrine, la part des voies oxydatives et hydrolytiques pour chaque isomère est dépendante de l'espèce. La voie majoritaire de métabolisme est, pour l'isomère *trans*, l'hydrolyse chez le rat et l'oxydation chez l'homme, et pour l'isomère *cis*, l'oxydation chez les deux espèces (Scollon *et al.* 2009; Shono *et al.* 1979).

III.3.a.i. Hydrolyse

La perméthrine est hydrolysée par des CE, enzymes ubiquitaires, présentes chez les mammifères, au niveau du foie, de l'intestin, des reins et des poumons (Sato and Hosokawa 2006).

Les CE sont classées en cinq familles dont les deux plus importantes sont les familles CES1 et CES2 (Sato and Hosokawa 2010). La répartition de ces enzymes dans l'organisme dépend de l'organe et de l'espèce (Tableau 13).

Les CE appartenant à la famille CES1 sont majoritairement présentes au niveau du foie. Sont recensés la carboxylestérase humaine 1 (hCE1), spécifique de l'homme, et les hydrolases A et B, présentes chez le rat. La sous famille CES1G regroupe des CE ayant la particularité d'être sécrétées dans le sang. Ces CE circulantes n'existent que chez le rat et la souris (Sato and Hosokawa 2010). La localisation précise (plasma ou globules rouges) de l'enzyme demeure inconnue (Sanghani *et al.* 2004).

Les CE de la famille CES2 sont présentes au niveau de l'intestin. Peut être citée l'hCE2, présente chez l'homme (Sato and Hosokawa 2010).

Le métabolisme des pyréthrinoïdes par les CE est complexe car les sites diffèrent selon l'espèce (Tableau 14).

Chez le rat, l'hydrolyse se situe au niveau de trois sites : le foie principalement, le sang et l'intestin. Dans le foie, la perméthrine est métabolisée par les hydrolases A et B, qui représentent 80 % des CE du foie (Godin *et al.* 2006; Morgan *et al.* 1994; Ross *et al.* 2012). La présence d'une CE circulante permet l'hydrolyse de la perméthrine dans le sang.

Chez l'homme, les sites d'hydrolyse sont au nombre de deux : le foie et l'intestin. Les enzymes impliquées sont l'hCE1 au niveau du foie (Crow *et al.* 2007; Mikata *et al.* 2012; Scollon *et al.* 2009) et l'hCE2 dans l'intestin (Nishi *et al.* 2006). L'hydrolyse de la perméthrine n'existe pas au niveau du sang chez l'homme car le sang humain ne contient pas de CE. Il contient cependant des estérases d'autre nature comme les butyrylcholinestérases ou les paraoxonases (Crow *et al.* 2007; Li *et al.* 2005; Ross *et al.* 2006).

Tableau 13. Expression des familles CES1 et CES2 selon les tissus chez le rat et l'homme (Sato and Hosokawa 2010)

	Isoenzymes	Foie	Intestin	Rein	Poumon
Rat	CES1	+++	-	+++	+++
	CES2	-	+++	-	-
Homme	CES1	+++	-	+	+++
	CES2	+	+++	+++	-

- : non détectable ; + : faiblement exprimée ; ++ : modérément exprimée ; +++ : fortement exprimée

Tableau 14. Sites d'hydrolyse des pyréthrinoïdes chez le rat et l'homme avec les enzymes impliquées

Rat	Homme
Foie (<i>Hydrolase A et B</i>)	Foie (<i>hCE1</i>)
Intestin	Intestin (<i>hCE2</i>)
Sang	

III.3.a.ii. Oxydation

L'oxydation de la perméthrine, réalisée par des CYPs, a lieu au niveau du foie et de l'intestin.

Les CYPs sont des enzymes de type mono-oxygénase, localisées au niveau du réticulum endoplasmique de la cellule et consommatrice d'oxygène et de NADPH (Gueguen et al. 2006). Les CYPs, enzymes de phase I, ont la caractéristique d'avoir une spécificité chevauchante et relative. Un seul isoforme peut métaboliser plusieurs substrats et un seul substrat peut être métabolisé par plusieurs isoformes. La répartition des CYPs dans l'organisme dépend de l'organe et de l'espèce. La part oxydative (CYP) du métabolisme peut être déterminée sur microsomes par la variation de la quantité de cofacteurs, NADPH en particulier (Scollon et al. 2009).

Pour les deux isomères de la perméthrine, les CYP 1A1, 1A2, 2C6, 2C11, 3A2 (et 3A1 pour la *cis*-perméthrine) et les CYP 1A1, 1A2, 2C8, 2C9, 2C19 (et 3A4 pour la *cis*-perméthrine) sont impliqués respectivement dans l'oxydation de la perméthrine chez le rat et l'homme (Mikata et al. 2012; Scollon et al. 2009). Une hiérarchisation de l'implication de ces CYPs dans l'oxydation de la perméthrine (Scollon et al. 2009) a été réalisée en incubant pendant 10 min les deux isomères sur des supersomes exprimant un seul isoforme de CYP (Tableau 15). Chez le rat, les CYP2C6 et 2C11 métabolisent en plus grande quantité la *cis*- et *trans*-perméthrine, avec un métabolisme évalué à 80 % après 10 min d'incubation. Chez l'homme, le CYP2C19 est le plus impliqué dans le métabolisme des deux isomères. Les autres CYPs étudiés ne les métabolisent qu'à la hauteur de 30 %. La forme oxydée de la perméthrine peut ensuite être hydrolysée par les CEs.

L'hydrolyse et l'oxydation de la perméthrine vont entraîner l'apparition de formes oxydées ou non des métabolites directs DCCA et de l'alcool 3-phénoxybenzoïque (3-PBAIc). Le 3-PBAIc subira plusieurs transformations pour devenir le métabolite final 3-PBA (Figure 23). Le 3-PBAIc est rapidement transformé en l'aldéhyde 3-phénoxybenzyle (3-PBAId). Les enzymes impliquées chez le rat sont principalement le CYP2C6 suivi du CYP3A1 (Nakamura et al. 2007). L'activité métabolique mesurée sur des cellules surexprimant les CYP2C6 et CYP3A1 étaient respectivement de 40 et 8 nmol/min/nmol de CYPs. L'activité métabolique par les autres isoformes étudiés (CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1, CYP2D1 et CYP2E1) était inférieure à 5 nmol/min/nmol de CYPs (Nakamura et al. 2007). Chez l'homme, l'alcool déshydrogénase (ADH) permet la formation du 3-PBAId (Choi et al. 2002).

Tableau 15. Pourcentage de métabolisme par isoforme de CYP450 chez le rat et l'homme de la *cis*- et *trans*-perméthrine (Scollon et al. 2009)

CYP	Rat		CYP	Homme	
	<i>Cis</i> -perméthrine	<i>Trans</i> -perméthrine		<i>Cis</i> -perméthrine	<i>Trans</i> -perméthrine
1A1	47 ± 8	58,3 ± 7,5	1A1	13,3 ± 3,8	27 ± 2,6
1A2	12,3 ± 4,5	38,3 ± 7,5	1A2	22 ± 2,6	24,3 ± 2,1
2A1	N.S.	N.S.	2B6	N.S.	N.S.
2B1	N.S.	N.S.	2C8	19,3 ± 2,3	18,3 ± 2,5
2C6	83,7 ± 5	88,7 ± 2,1	2C9*1	39,3 ± 2,9	N.S.
2C11	77,7 ± 15,9	82 ± 5,3	2C9*2	N.S.	22,6 ± 2,1
2C12	N.S.	N.S.	2C9*3	N.S.	N.S.
2C13	N.S.	N.S.	2C19	83,3 ± 4,5	89,7 ± 0,6
2D1	N.S.	N.S.	3A4	25 ± 9,6	N.S.
2D2	N.S.	N.S.			
3A1	30,3 ± 5,5	N.S.			
3A2	16,7 ± 1,2	13,3 ± 3,5			

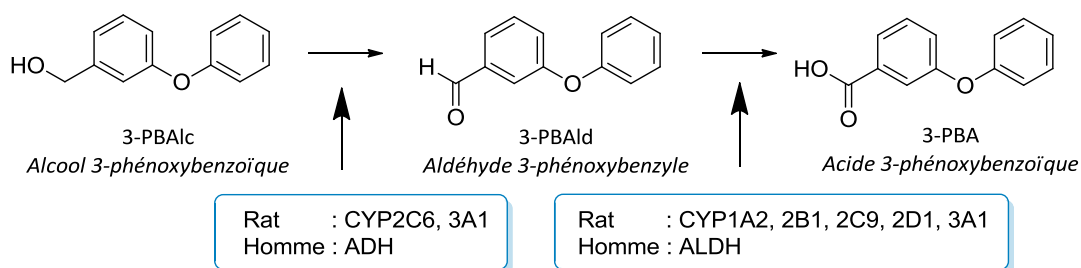


Figure 23. Schéma des différentes étapes de formation du 3-PBA à partir du 3-PBAIc avec les enzymes impliquées chez le rat et l'homme

Ensuite, le 3-PBAIld est métabolisé en 3-PBA, le métabolite final. Chez le rat, les CYP 1A2, 2B1, 2C9, 2D1 et 3A1 présentait une activité métabolique sur cellules recombinantes entre 25 et 35 nmol/min/nmol de CYPs. L'activité des CYP1A1 et CYP2E1 était inférieure à 10 nmol/min/nmol de CYPs (Nakamura *et al.* 2007). L'enzyme impliquée chez l'homme est l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH) (Choi *et al.* 2002). Chez l'homme, les CYPs ne semblent pas impliqués dans la formation du 3-PBA à partir du 3-PBAIc. L'incubation des deux isomères sur microsomes de foie ou cytosol humain avec un système régénérant (NADPH) entraînait la formation des métabolites de la perméthrine. Cependant, l'expérience menée sur des isoformes spécifiques de CYPs humains, selon le même procédé que l'étude de Nakamura *et al.* (2007), a montré une absence de 3-PBA.

La forme oxydée du 3-PBAIc provenant, soit de l'oxydation et de l'hydrolyse de la perméthrine, soit de l'oxydation du 3-PBAIc par les CYP2E1, 2D6 et 2C19 chez l'homme (Takaku *et al.* 2011) subit les mêmes étapes de transformation pour former le 4'-OH-PBA.

Les formes oxydées ou non du DCCA et 3-PBA sont ensuite conjuguées avec des groupements glucuronide ou sulfate par des enzymes de phase II comme l'UGT 1A9 (Takaku *et al.* 2011). Leur élimination vers les urines ou la bile est ainsi facilitée. L'ensemble des voies de métabolisme de la *cis*- et *trans*-perméthrine et de formation des métabolites 3-PBA et DCCA et leur formes oxydées est représenté sur la Figure 24.

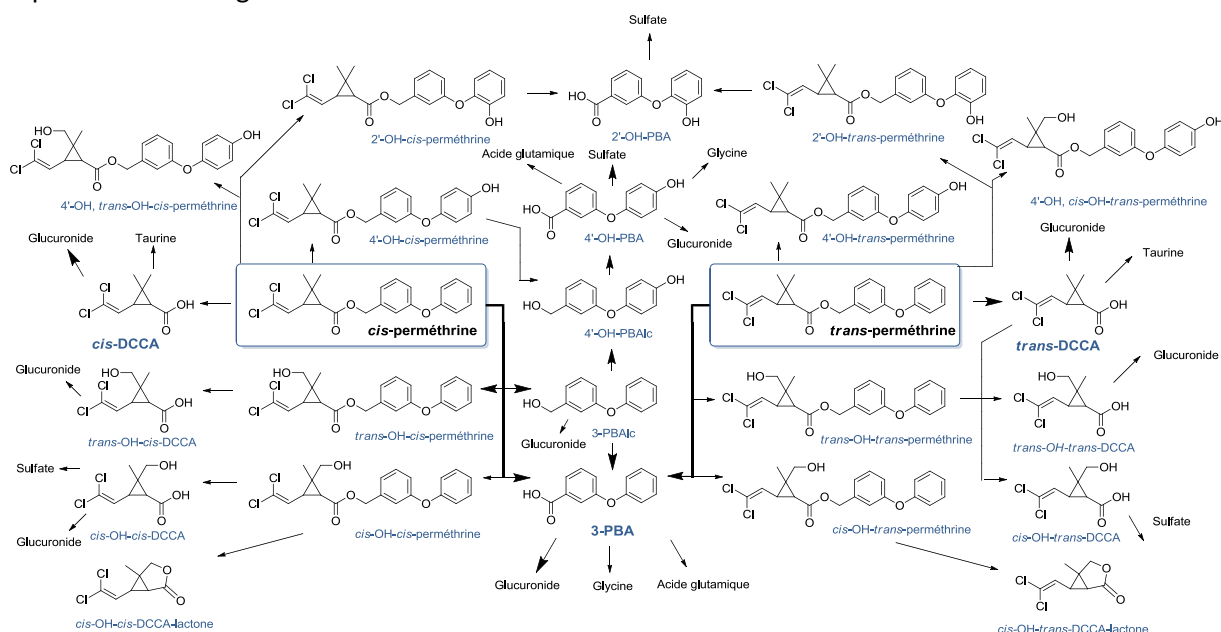


Figure 24. Représentation de l'ensemble des voies métaboliques empruntées par la *cis*- et *trans*-perméthrine chez les mammifères (Gaughan *et al.* 1977)

III.3.b. Quantification du métabolisme de la perméthrine chez le rat et l'homme

Parallèlement à la compréhension du métabolisme de la *cis*- et *trans*-perméthrine, le métabolisme *in vitro* de la perméthrine a pu être quantifié chez le rat et l'homme. Alors que la plupart des études *in vitro* se sont intéressées à la vitesse de formation du métabolite direct 3-PBAIc de la perméthrine (Crow *et al.* 2007; Ross *et al.* 2006), une seule étude a quantifié la disparition du composé parent. Cette approche tient compte alors de l'ensemble des chemins de métabolisme de la perméthrine, c'est-à-dire oxydation et hydrolyse (Scollon *et al.* 2009).

La formation du 3-PBAIc est le plus souvent étudiée sur microsomes sans la présence de cofacteurs, caractérisant uniquement la voie d'hydrolyse (Crow *et al.* 2007; Ross *et al.* 2006). Les études menées, chez le rat et l'homme, sur sérum et microsomes et cytosol d'hépatocytes ont permis de déterminer les valeurs des paramètres V_{max} et K_m (Tableau 16). L'hydrolyse de la *trans*-perméthrine dans le sérum semble importante chez le rat, mais rapportée au poids corporel, elle devient minoritaire par rapport à celle dans le foie. L'étude de Crow *et al.* (2007) sur les fractions hépatocytaires a permis de démontrer l'implication du cytosol dans le métabolisme des pyréthriinoïdes. Chez le rat, 40 % de l'hydrolyse hépatique de la *trans*-perméthrine est due aux estérases présentes dans le cytosol (Crow *et al.* 2007). Une étude plus approfondie a démontré la présence d'hCE1 dans le cytosol. Le taux de cette enzyme est alors trois fois plus faible dans le cytosol que sur les microsomes. Pour l'hydrolyse de la *cis*-perméthrine, des différences inter-espèces existent. Au niveau des microsomes hépatiques, l'hydrolyse est plus rapide chez l'homme que chez le rat, dans un ratio de 2,5. De plus, la part d'hydrolyse attribuable au cytosol par rapport aux microsomes est aussi plus importante chez l'homme que chez le rat.

Tableau 16. Valeurs des paramètres V_{max} (nmol/min/mg prot ou mL sérum), K_m (μM) et du ratio V_{max}/K_m (mL/min/mg prot ou mL sérum) de l'hydrolyse de la *cis*- et *trans*-perméthrine obtenus sur sérum de rat et microsomes et cytosol hépatiques de rat et d'homme, issues de Crow *et al.* (2007) (a) et Ross *et al.* (2006) (b)

Espèce	Condition	<i>Cis</i> -perméthrine			<i>Trans</i> -perméthrine		
		V_{max}	K_m	V_{max}/K_m	V_{max}	K_m	V_{max}/K_m
Rat	Sérum ^a	-	-	-	4,2 ± 0,5	29,4 ± 8,3	0,143
Rat	Microsome hépatique ^b	0,10 ± 0,01	30,78 ± 9,25	3,25.10 ⁻³	1,34 ± 0,27	19,16 ± 3,24	0,068
Homme	Microsome hépatique ^b	0,02 ± 0,002	2,49 ± 2,14	8,03.10 ⁻³	1,12 ± 0,05	20,66 ± 2,95	0,053
Rat	Cytosol hépatique ^a	-	-	-	0,56	24,6	0,023
Homme	Cytosol hépatique ^a	-	-	-	0,47 ± 0,02	3,4 ± 0,8	0,138

Tableau 17. Activités spécifiques du plasma, de fraction cellulaire de l'intestin, du foie et du poumon (nmol/min/mg prot) sur la *cis*- et *trans*-perméthrine chez le rat (issues de Nakamura *et al.* (2007) (a) et Crow *et al.* (2007) (b))

	<i>Cis</i> -perméthrine	<i>Trans</i> -perméthrine
Plasma	-	2,53 ± 0,21 ^a
Intestin		
<i>Microsomes</i>	0,09 ± 0,05 ^a	0,7 ± 0,2 ^a 0,42 ± 0,07 ^b
<i>Cytosol</i>	-	0,29 ± 0,02 ^b
Foie (<i>microsomes</i>)	0,14 ± 0,07 ^a	2,23 ± 0,27 ^a
Poumon (<i>microsomes</i>)	-	0,42 ± 0,07 ^a

Par la suite, d'autres sites de métabolisme ont été étudiés grâce à la *trans*-perméthrine (Crow *et al.* 2007; Nakamura *et al.* 2007) (Tableau 17). Au niveau de l'intestin, l'activité spécifique sur microsomes humains ($1,88 \pm 0,55$ nmol/min/mg de protéines) était 2,6 à 4,5 fois plus importante que celle chez le rat. Chez le rat, l'activité spécifique d'hydrolyse hépatique et plasmatique de la *trans*-perméthrine est similaire, comme ce qu'il avait été observé pour les valeurs de V_{max} et K_m (Tableau 16). Cependant, la comparaison des valeurs de K_m pour les CE du sérum et du foie montre que la *trans*-perméthrine a une plus faible affinité pour les enzymes sériques qu'hépatiques. L'hydrolyse sanguine chez le rat ne représenterait que 4 % de la capacité totale d'hydrolyse du rat. L'hydrolyse intestinale, quant à elle, équivaldrait à 2,5 %. Ces résultats soulignent la faible implication de l'hydrolyse sanguine et intestinale dans le métabolisme total *in vivo* de la perméthrine chez le rat.

La seule étude traitant de la disparition du composé parent a permis d'estimer la clairance hépatique de la *cis*- et *trans*-perméthrine, seule et en mélange, chez le rat et l'homme (Scollon *et al.* 2009). Les valeurs des paramètres V_{max} et K_m ont été déterminées uniquement chez le rat, lors de l'incubation des composés séparée et en mélange (Scollon *et al.* 2009). Comparée à la *cis*-perméthrine, la *trans*-perméthrine présente une affinité 2,4 fois plus faible pour les enzymes responsables de sa dégradation, mais une vitesse de transformation 6,9 fois plus élevée. Les valeurs de V_{max} pour les deux isomères sont identiques entre l'expérience étudiant l'hydrolyse (Ross *et al.* 2006) et le métabolisme complet de la perméthrine (Scollon *et al.* 2009). En revanche, les valeurs de K_m sont plus élevées dans l'expérience de Ross *et al.* (2006). Les valeurs obtenues pour le ratio V_{max}/K_m (Ross *et al.* 2006) correspondent respectivement à 8 et 62 % du métabolisme total de la *cis*- et *trans*-perméthrine décrit par Scollon *et al.* (2009). Ces résultats confirment que chez le rat, la *trans*-perméthrine est majoritairement hydrolysée et la *cis*-perméthrine fortement oxydée. Lors de l'étude sur le mélange d'isomères, les valeurs moyennes des paramètres diffèrent de celles obtenues suite à l'incubation séparée des substances. Pour la *cis*-perméthrine, les valeurs moyennes du V_{max} et du K_m ont toutes les deux augmentées. Pour la *trans*-perméthrine, la valeur du V_{max} reste constante et celle du K_m diminue d'un facteur 2. La distribution des valeurs entre les deux conditions est cependant chevauchante, hormis celle du V_{max} de la *cis*-perméthrine.

Tableau 18. Valeurs moyennes avec l'intervalle à 95 % des paramètres V_{max} (nmol/min/mg prot), K_m (μ M) et du ratio V_{max}/K_m (mL/min/mg prot) de la *cis*- et *trans*-perméthrine obtenues sur microsomes hépatiques de rat (Scollon *et al.*, 2009)

	<i>Cis</i> -perméthrine			<i>Trans</i> -perméthrine		
	V_{max}	K_m	V_{max}/K_m	V_{max}	K_m	V_{max}/K_m
Seule	0,14 (0,11 – 0,20)	3,70 (1,60 – 9,20)	0,04	0,97 (0,82 – 1,23)	9,03 (5,66 – 15,42)	0,11
Mélange	0,41 (0,35 – 0,52)	5,39 (3,11 – 10,39)	0,08	0,82 (0,61 – 1,25)	4,48 (1,80 – 12,86)	0,18

Dans cette même étude, les clairances intrinsèques *in vitro* hépatiques ont été obtenues pour chaque composé chez le rat et l'homme à des concentrations d'incubation inférieures à la valeur du K_m de chaque isomère (Tableau 19).

Une différence inter-espèce existe cependant au niveau de la valeur de vitesse de métabolisme : l'élimination est 0,7 et 10 fois plus lente chez l'homme que chez le rat pour respectivement la *trans*-perméthrine et la *cis*-perméthrine. Lors de cette étude, l'estimation des vitesses de disparition du mélange *cis/trans*-perméthrine a montré une possible interaction entre ces deux composés. Chez l'homme, la clairance de la *cis*- et *trans*-perméthrine était diminuée respectivement d'un facteur 1,7 et 2,8. Chez le rat, la clairance diminuait d'un facteur 2 pour la *trans*-perméthrine. Aucune interaction n'était observée pour la *cis*-perméthrine, s'expliquant par des voies de métabolisme majoritaires différentes selon les deux espèces. Chez l'homme, l'oxydation est la voie majoritaire pour les deux isomères, pouvant alors entraîner une compétition au niveau des sites d'oxydation. Une inhibition de type compétitive a été suggérée.

Des études d'induction sur hépatocytes primaires de rat et humains, sur plusieurs jours, ont montré que la perméthrine induit les CYP2B1 et 3A23 chez le rat (Heder *et al.* 2001). Certains pyréthrinoïdes (perméthrine non testé) augmenteraient l'expression du CYP3A4. Celle des CE n'était pas affectée (Yang *et al.* 2009).

En dehors du métabolisme *in vitro*, la fraction liée aux protéines, autre paramètre parfois pris en compte lors de l'extrapolation *in vitro-in vivo*, a été estimée. Dans le plasma humain, à une concentration proche de celle retrouvée lors d'une exposition à la perméthrine, le pourcentage de la fraction libre de *cis* ou *trans*-perméthrine était faible, avec la valeur d'environ 12 %, avec un pourcentage lié aux lipoprotéines d'environ 30 % et aux protéines (albumine) d'environ 60 % (Sethi *et al.* 2014).

Tableau 19. Valeurs de clairance intrinsèque *in vivo* (μ L/min/kg) de la *cis*- et *trans*-perméthrine obtenues sur microsomes hépatiques en présence de NADPH de rat et d'homme (Scollon *et al.*, 2009)

Conditions	<i>Cis</i> -perméthrine		<i>Trans</i> -perméthrine	
	CL_{int} rat	CL_{int} homme	CL_{int} rat	CL_{int} homme
Seule	529 ± 19	52 ± 12	438 ± 46	636 ± 53
Mélange	591 ± 32	31 ± 13	267 ± 25	226 ± 68

Objectifs

OBJECTIFS

La présence de résidus de pyréthrinoïdes dans l'environnement et dans certaines matrices biologiques montre une imprégnation de la population humaine à ces insecticides. Au vu des sources d'expositions multiples, la quantification de l'exposition réelle demeure difficile. Associés aux perturbations neuronales et hormonales suspectées, ces résultats soulignent la présence d'un risque potentiel lié à l'exposition de la population aux pyréthrinoïdes. Le niveau de toxicité dépendant de la concentration du composé parent présent dans l'organisme, la quantification de l'exposition interne au niveau des tissus cibles est désormais nécessaire. Parmi les pyréthrinoïdes, la perméthrine a été retenue pour ce travail de thèse, existant sous deux formes isomériques *cis* et *trans*. La population est quotidiennement exposée à cet insecticide.

La détermination de la cinétique des pyréthrinoïdes chez l'homme est une étape essentielle à la compréhension du risque. Or les seules données disponibles chez l'homme sont les biomarqueurs d'exposition, présents le plus souvent dans les urines. Dans le cas des pyréthrinoïdes, les biomarqueurs d'exposition sont leurs métabolites. Une autre difficulté lors de la quantification de l'exposition externe aux pyréthrinoïdes réside dans l'existence de métabolites communs entre ces composés. L'attribution d'un métabolite à l'exposition à un composé parent spécifique est alors difficile. L'accès direct aux concentrations tissulaires en pyréthrinoïdes est impossible chez l'homme pour des raisons évidentes. En cela les modèles PBPK sont un outil capable de relier les données de biosurveillance aux données internes dans les tissus cibles. Pour cela, ce lien doit être en premier lieu modélisé chez le rat pour chaque isomère de la perméthrine. Au sein de cette espèce, la quantification simultanée des concentrations tissulaires en pyréthrinoïdes et en métabolites dans les urines est en effet réalisable. Actuellement, les différentes phases ADME des isomères de la perméthrine et de ses métabolites couramment dosés en biosurveillance (3-PBA et DCCA) n'ont jamais été caractérisées simultanément chez le rat. De plus, au commencement de la thèse, il n'existait aucune méthode analytique permettant de doser simultanément les isomères *cis* et *trans* de la perméthrine et de ses métabolites *cis*- et *trans*-DCCA et 3-PBA dans des matrices biologiques solides et liquides, à composition extrêmement différente.

Les modèles PBPK permettent par leur cadre paramétrique l'extrapolation inter-espèce et la simulation de différents scénarios d'exposition. Pour cela, la relation entre parents et métabolites doit être déterminée au sein de la nouvelle espèce. Les résultats actuels des études *in vitro* ont permis de quantifier certaines voies métaboliques de la *cis*- et *trans*-perméthrine, sans préciser la formation des différents métabolites 3-PBA et DCCA. Afin d'estimer des vitesses de métabolisme *in vivo* de qualité, certains points expérimentaux au niveau *in vitro* sont à prendre en compte. Les propriétés lipophiles de la perméthrine font de l'évaluation des liaisons aspécifiques dans le système une étape indispensable. Le choix d'un système cellulaire complet comme les hépatocytes est nécessaire, compte tenu de l'implication des microsomes et du cytosol dans le métabolisme de la

perméthrine. Les hépatocytes primaires sont de plus un support de choix dans le cadre d'une extrapolation *in vitro-in vivo* des données de métabolisme.

Nous proposons ainsi de caractériser la relation entre le composé toxique, la perméthrine, et ses biomarqueurs urinaires, 3-PBA et DCCA chez le rat et l'homme. Plusieurs étapes ont été suivies pour y répondre :

- Une méthode analytique capable de quantifier simultanément les isomères de la perméthrine et ses métabolites (3-PBA, *cis*- et *trans*-DCCA) dans différentes matrices a tout d'abord été mise en place
- Un modèle PBPK pour chaque isomère de la perméthrine, associé à un modèle pour chaque métabolite, a ensuite été développé. Des expériences de cinétique chez le rat ont été réalisées avec les deux isomères séparés de la perméthrine pour calibrer le modèle. Les paramètres toxicocinétiques relatifs au processus ADME, en particulier l'excrétion, ont été estimés pour chacun des composés
- Le métabolisme hépatocytaire de la perméthrine chez l'homme a ensuite été quantifié. Des expériences *in vitro* sur des hépatocytes primaires humains avec les isomères *cis* et *trans* séparés ont été menées dans des conditions expérimentales optimales pour l'extrapolation *in vitro-in vivo* des données. L'effet de la co-incubation des deux isomères sur leur cinétique respective a aussi été évalué.

Résultats

I. METHODE DE DOSAGE DE LA PERMETHRINE ET DE SES METABOLITES

Publié dans *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2014) **406**, 3477-3487

Une méthode analytique a été développée pour quantifier simultanément les composés parents (*cis*- et *trans*-perméthrine) et ses métabolites couramment dosés dans les études de biosurveillance les *cis*- et *trans*-DCCA et le 3-PBA. Une des contraintes lors du développement de la méthode était de pouvoir doser ces différents composés dans des matrices biologiques de nature très diverse : tissus (rein, cerveau, foie, muscle, testicule, graisse, fèces) et fluides (sang total, plasma, globules rouges).

Les composés d'intérêt présents dans l'échantillon ont été dérivés en utilisant un mélange méthanol/acide chlorhydrique et extraits ensuite par du toluène. L'analyse a été réalisée en chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse de type "trappe d'ion" en mode MS/MS. La sélectivité obtenue pour des matrices complexes telles que les organes de rat a permis d'éviter l'utilisation d'une étape de purification pour toutes les matrices étudiées, hormis les graisses. L'analyse des graisses avec cette méthode présentait un bruit de fond très important provenant des lipoprotéines présentes dans l'échantillon. La détection des composés était alors masquée. Une autre méthode d'extraction a donc été développée pour ce tissu, comprenant une étape de purification de l'échantillon avec du Stata X-AW. L'extraction était cette fois-ci réalisée avec de l'acétonitrile.

Dans les fluides, les limites de quantification ont été établies à 50 ng/mL pour les composés parents et le 3-PBA, et à 25 ng/mL pour les *cis*- et *trans*-DCCA. Pour les tissus, les limites de quantification de la *cis*- et *trans*-perméthrine s'étendent de 50 ng/g dans les muscles à 100 ng/g dans le cerveau et les testicules. Les rendements d'extraction varient entre 80 et 120 % pour les matrices testées. L'ajout d'acide formique à 1 % V/V aux fluides a permis d'améliorer la stabilité des composés dans l'échantillon. Les méthodes mises au point ont été appliquées à une étude de toxicocinétique préliminaire. Des rats adultes Sprague-Dawley ont été exposés oralement aux doses de 5 et 20 mg/kg de *cis*- ou *trans*-perméthrine. Les différentes matrices décrites précédemment ont été prélevées aux temps 2, 6 et 24 h. La *cis*-perméthrine et ses métabolites ont été quantifiés dans toutes les matrices tandis que la *trans*-perméthrine a été quantifiée uniquement dans le sang, le plasma, les fèces et les graisses. Les concentrations en perméthrine dans les graisses étaient encore très importantes à 24 h et similaires à celles obtenues après 2 h d'exposition. Les concentrations en métabolites de la *trans*-perméthrine étaient plus élevées que celles des métabolites de la *cis*-perméthrine.

Determination of *cis*-, *trans*-permethrin and associated metabolites in rat blood and organs by gas chromatography ion trap mass spectrometry

François Lestremau ^{1*}, Marie-Emilie Willemin ^{2,3}, Claudine Chatellier ¹, Sophie Desmots ⁴, Céline Brochot ²

¹ Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), Unité Innovation pour la Mesure (NOVA), Parc ALATA BP2, 60550 Verneuil en Halatte, France

² Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), Unité Modèles pour l'Ecotoxicologie et la Toxicologie (METO), Parc ALATA BP2, 60550 Verneuil en Halatte, France

³ Université de Technologie de Compiègne, CNRS UMR 7338, Laboratoire de Biomécanique et Bio ingénierie, France

⁴ Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), Unité Toxicologie Expérimentale (TOXI), Parc ALATA BP2, 60550 Verneuil en Halatte, France

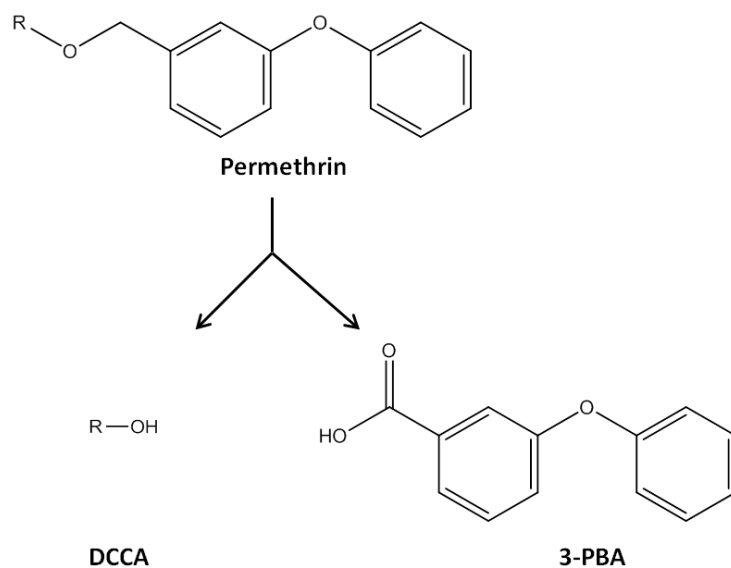
Analytical and Bioanalytical Chemistry (2014) **406**, 3477-3487.

Abstract

An analytical method was developed to measure *cis*-permethrin and *trans*-permethrin in different biological rat matrices and fluids (whole blood, red blood cells, plasma, brain, liver, muscle, testes, kidneys, fat and faeces). The method was also suitable for the simultaneous quantification of their associated metabolites [*cis*-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethyl-(1-cyclopropane) carboxylic acid (*cis*-DCCA), *trans*-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethyl-(1-cyclopropane)carboxylic acid (*trans*-DCCA) and 3-phenoxybenzoic acid (3-PBA)] in blood (whole blood, red blood cells, plasma) and liver.

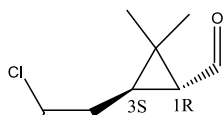
The target analytes were derivatised in samples using a methanolic/hydrochloric acid solution and then extracted with toluene. The analysis was performed by gas chromatography, and detection using ion trap tandem mass spectrometry. The selectivity obtained for complex matrices such as rat organs allowed the use of a purification step to be avoided for most of the matrices investigated. In the case of fat, where permethrin is suspected to accumulate, a dedicated purification step was developed. In fluids, the limits of quantification were at the 50 ng/mL level for the parent compounds and 3-PBA and at 25 ng/mL for *cis*-DCCA and *trans*-DCCA. For solid matrices excluding fat, the limits of quantification ranged from 50 ng/g for muscle to 100 ng/g for brain and testes for both *cis*-permethrin and *trans*-permethrin. The extraction recoveries ranged primarily between 80 and 120 % for the matrix tested. The stability of blood samples was tested through the addition of 1 % v/v formic acid. The methods developed were applied in a toxicokinetic study in adult rats. *cis*-Permethrin and the metabolites were detected in all corresponding matrices, whereas *trans*-permethrin was detected only in blood, plasma and faeces.

Key words: Biological samples - Bioanalytical methods - Gas chromatography - Mass spectrometry/ion trap mass spectrometry - Pesticides/endocrine disruptor

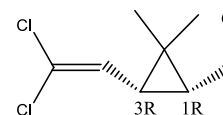


Where **R** may be

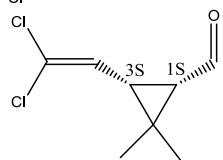
R₁ : [1*R*,3*R*] *cis*



R₃ : [1*R*,3*S*] *trans*



R₂ : [1*S*,3*S*] *cis*



R₄ : [1*S*,3*R*] *trans*

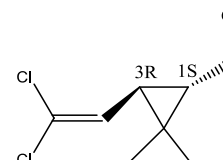


Figure 25. Metabolic pathway of permethrin with the formation of 3-phenoxybenzoic acid (3-PBA) and 3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethyl-(1-cyclopropane) carboxylic acid (DCCA)

Introduction

Pyrethroid insecticides represent approximately one quarter of the worldwide insecticide market. They have been widely used in wood preservation, disinfection, mosquito control and also in wool carpets and textiles to prevent insect damage [1,2]. Pyrethroids are now detected in indoor and outdoor environments [3,4] as well as in humans [5]. Although reported to be less toxic to mammals than other pesticides, pyrethroids are suspected to induce neurotoxicological and developmental alterations in mammals [6-10].

Permethrin [3-phenoxybenzyl (1*RS*,3*RS*;1*RS*,3*SR*)-*cis*,*trans*-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate]] is one of the most widely used pyrethroids. Permethrin is a chiral compound with two stereocentres in the cyclopropane ring (Figure 25) [11] and is usually produced as a mixture of the two stereoisomers (*cis/trans* ratios of 40:60, 80:20 or 25:75). As neurotoxicants, *cis*-permethrin and *trans*-permethrin both act on the nervous system of insects by interfering with sodium channels to disrupt neuronal activity [12]. In mammals, once absorbed, permethrin is rapidly distributed to various organs/tissues (liver, brain, adipose tissues, etc.) and is transformed into metabolites that are subsequently excreted in urine and faeces [13, 14]. In rats, *cis*-permethrin and *trans*-permethrin are hydrolysed in the blood, small intestine and liver by an ester cleavage, due to the presence of carboxylesterases, to *cis*- and *trans*-3-(2,2Dichlorovinyl)-2,2-dimethyl-(1-cyclopropane) carboxylic acid (*cis*- and *trans*-DCCA) and 3-phenoxybenzoic alcohol [11,15]. 3-phenoxybenzoic alcohol is then oxidized to form 3-phenoxybenzoic acid (3-PBA) in the liver by cytochromes P450 or deshydrogenases (Figure 25) [16,17]. Even though they share the same metabolic pathways, the *cis* isomer is metabolized three times more slowly than the *trans* isomer [18].

Several analytical strategies have been proposed to measure the different permethrin isomers and their metabolites in biological matrices. Analyses have been performed using high-performance liquid chromatography (LC) coupled with ultraviolet detection, in which *cis* and *trans* forms were separated [17, 16]. The use of a special chiral column makes possible separation of the four enantiomers (1*R*,3*R*)- *cis*, (1*S*,3*S*)-*cis*, (1*R*,3*S*)-*trans*, (1*S*,3*R*)-*trans* [6]. *cis*-Permethrin and *trans*-permethrin have also been monitored by LC coupled with tandem mass spectrometry (MS/MS) to improve sensitivity in comparison to high-performance LC coupled with ultraviolet detection [19]. As permethrin is a non-polar and semivolatile compound, it is more commonly analysed by gas chromatography (GC) coupled with flame ionization detection [20], electron capture detector [21] or mass spectrometry (MS) [22]. The metabolites *cis*-DCCA, *trans*-DCCA and 3-PBA are very polar substances and can be monitored by LC-MS/MS [23] since they are easily ionized in a positive electrospray ionization mode. They can also be analysed by GC using a derivatization step [24, 21]. In this case, they have been primarily analysed by GC-MS [21] or GC coupled with high resolution MS [25]. Permethrin has been previously monitored in blood or plasma and organs such as the brain, whereas metabolites have been primary measured in urine or plasma [14,21,13]. To the best of our knowledge, the metabolites and the permethrin compounds have not been monitored simultaneously in organs, but have been monitored only in cellular fractions of organs (such as liver or intestine microsomes) exposed during *in vitro* experiments [16,17].

In this study, we aimed to develop an analytical method to monitor simultaneously *cis*-permethrin, *trans*-permethrin and their metabolites (*cis*-DCCA, *trans*-DCCA and 3-PBA) in the biological fluids and

organs of rats. According to the toxicokinetic properties and the target organs for toxicity of permethrin, the following fluids, organs or tissues were of interest: whole blood, red blood cell (RBCs), plasma, fat, brain, testes, liver, kidney, muscle and faeces. Urine was not analysed in this study as analytical methods are already available for this matrix [26,21]. Despite the differences in physico-chemical properties and content of the investigated matrices, the extraction method was intended to be relatively simple and single step. With this objective, the selectivity of the detection was of utmost importance. Therefore, the analysis of these samples by GC-MS/MS ion trap detection was investigated and the experimental parameters optimized. The validated analytical method was applied to a toxicokinetic study in adult rats exposed to *cis*- and *trans*-permethrin separately.

Experimental

Chemicals

For analytical measurements, *cis*-permethrin (purity, 99 %) was purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France) and *trans*-permethrin (99 %) from Cluzeau Info Labo (Sainte-Foy-La-Grande, France). A mixture of the metabolites *cis*-DCCA and *trans*-DCCA (54:46 *cis/trans*) was acquired from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany), and 3-PBA (98 %) was obtained from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA). The internal standards *cis*-[¹³C₆]permethrin (98 %) (50 ng/μL in nonane), *trans*-[¹³C₂]DCCA (98 %) and [¹³C₆]3-PBA (98 %) (both 100 ng/μL in nonane) were acquired from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA). For the toxicokinetic study, *cis*-permethrin (purity, 99.4 %) was provided by ChemService (West Chester, PA, USA) and *trans*-permethrin (99 %) was provided by Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany).

Hydrochloric acid was purchased from CarloErba (Val de Reuil, France) and methanol, toluene, acetonitrile and dichloromethane from Merck (Darmstadt, Germany). Solid-phase extraction cartridges (C₁₈) were provided by JT Baker (Phillipsburg, NJ, USA), and Florisil was provided by Grace (Epernon, France). Strata X-AW was from Phenomenex (Le Pecq, France).

Preparation of internal standard solutions

Stock solutions (250 μL) of *cis*-[¹³C₆]permethrin, [¹³C₆]3-PBA and *trans*-[¹³C₂]DCCA were reduced until dryness and then dissolved in 1 mL of methanol to obtain a mixture with respective concentrations of 12.5, 25 and 25 ng/μL.

Analytical system

A model 3800 gas chromatograph (Varian, Les Ullis, France) coupled with a Varian ion trap mass spectrometer 4000 was used. Injections were performed using a split/splitless injector equipped with a quartz wool liner and run in splitless mode at 250°C. The injection volume was 1 μL.

The GC column was a ZB-5MS (30 m × 0.25-mm inner diameter, 1.0-μm film thickness; Phenomenex, Le Pecq, France). It was used in pulse pressure at 16.8 psi for 1 min and then in constant flow at 1.3 mL/min. The temperature program started at 70°C for 1 min and then was ramped up by 10°C/min for 23 min to yield a final temperature plateau at 300°C for 10 min. The transfer line temperature was set at 250°C, the temperature of the manifold at 50°C and the trap and source temperatures at 200 and 220°C respectively.

The controls of the instrument and the data acquisition were performed using MS Workstation (Varian).

Animals

Male Sprague Dawley rats (Janvier Labs, Le Genest Saint Isle, France) were used to provide blank biological matrices and to characterize the toxicokinetics of *cis*- permethrin and *trans*-permethrin. For the toxicokinetic study, each rat was housed in a cage with a 12 h light/12 h dark cycle at ambient temperature (22°C ± 2°C) and relative humidity (55 ± 15 %). Food (Altromin for rat and mouse, Genestil, Royaucourt, France) and tap water were provided *ad libitum*.

Preparation of biological samples

Blood was collected in heparinized tubes after the rats had been euthanized with CO₂. To separate plasma and RBCs, blood samples were centrifuged for 5 min at 6,100 rpm using the model 5417R centrifuge (Eppendorf, Le Pecq, France). Formic acid (1 %) was added to the blood after collection and to the plasma after centrifugation to inhibit the metabolism of *cis*-permethrin and *trans*-permethrin by carboxylesterases and to preserve the stability of the compound [21]. All samples were frozen at -80°C. The liver, brain, testes, muscle, kidneys, fat and faeces were also immediately frozen at -80°C after collection. After they had been thawed, organs and faeces were manually ground with a mortar and pestle.

Extraction procedure

Biological fluids (blood, red blood cells, plasma)

Before extraction, all fluids were thawed and maintained at 4°C. Depending on the sample volume available, 0.5-1 mL of fluids were spiked with 40 µL of the internal standard solutions and mixed by vortex for 1 min. Then 1 mL of methanol and 1 mL of concentrated hydrochloric acid (10 M) were added and then stirred by vortex for 1 min. Samples were heated at 80°C for 20 min to produce a methyl ester derivate of the metabolites (3-PBA-Me, *cis*-DCCA-Me, or *trans*-DCCA-Me) and the internal standards. The samples were left to cool for 15 min, and then 2 mL of toluene was added. After they had been shaken for 20 min, the samples were centrifuged for 15 min at 3,000 rpm. Then, 1 µL of the supernatant was injected for GC-MS/MS analysis.

Organs (brain, muscle, testes, liver, kidney), fat and faeces

The extraction/derivatization method used for all organs (except fat) and faeces was similar to that developed for the fluids. For this, 40 µL of the internal stock solutions and 0.5 mL of methanol were added to 1 g of each matrix. This mixture was then ground with microbeads in Precellys homogenizer (Bertin, Montigny le Bretonneux, France). Then, 0.5 mL of methanol and 1 mL of concentrated hydrochloric acid (10 M) were added to each sample, then vortex mixing was applied for 1 min. After this step, the procedure was identical to that described for the biological fluids [described in "Biological fluids (blood, red blood cells, plasma)"], i.e. followed by a heating phase.

For fat, the extraction consisted in adding 40 µL of the internal stock solution to 0.5 g of fat mixed with 3 mL of 75:25 v/v acetonitrile/dichloromethane. Vortex mixing was performed for 1 min and centrifugation at 3,000 rpm was performed for 20 min at -10°C. After the reduction of 2 mL of the supernatant until dryness, the residue was dissolved in 2 mL of acetonitrile and a purification step was applied.

Two methods were considered for purification. The first method, based on NF EN 1528 [27], consisted in purifying the solvent extract using C₁₈ sorbent. C₁₈ sorbent (1 g) was added directly to the acetonitrile extract for dispersive solid-phase extraction. An alternative purification method was evaluated as conducted by Rawn et al. [28] on fish samples using Strata X-AW sorbent. The same extraction process was used but in this case, the purification step was performed with a blend of 100 mg of Strata X-AW and 150 mg of Na₂SO₄.

For both purification steps, the extract was then stirred by vortex for 1 min followed by a centrifugation at 3,000 rpm for 5 min. The supernatant was then extracted, reduced until dryness and dissolved in 1 mL of toluene. Then, 1 µL of this solution was injected for GC-MS/MS analysis.

Application in toxicokinetic studies

The analytical method was applied to study the distribution of *cis*-permethrin, *trans*-permethrin and their metabolites in adult rats. Rats were separated into two groups exposed to two different doses, 5 and 20 mg/kg bodyweight. These two doses were tested to check the relevance of our analytical method for low and high doses of permethrin. The substance was dissolved in corn oil in a total volume of 1 mL per kilogram of bodyweight and was administered orally to the rats. Food and water were provided *ad libitum* 3 h after the administration. Groups of two rats were euthanized by CO₂ at 2, 6 and 24 h after administration. Fluids and organs were collected by the procedure described in "Preparation of biological samples". The experimental protocol was approved by an internal ethics committee.

Quality control tests

For sample analysis, each sequence was checked with several quality control solutions at respective concentrations of 100 ng/mL and 600 ng/mL. The control samples were analysed every ten samples. When the measured concentrations of the control samples deviated from the expected concentrations beyond an 80 – 120 % range, a new calibration curve was obtained.

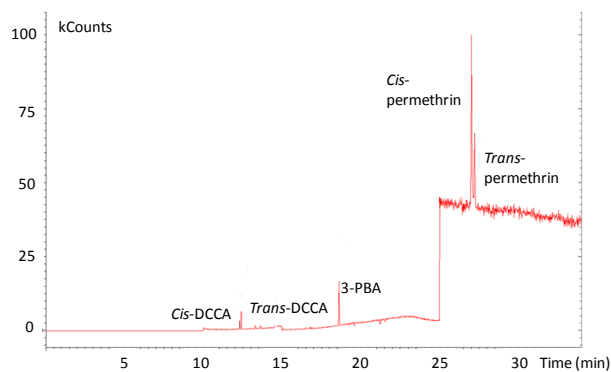


Figure 26. Chromatogram in selected ion monitoring mode of a standard solution for permethrin and derivatized metabolites (each 100 ng/ml)

Tableau 20. Settings for detection target analytes by ion trap tandem mass spectrometry

Compound	Retention time (min)	Acquisition segment (min)	Parent ion (m/z)	Excitation storage level (m/z)	Excitation Amplitude (V)	Quantification ion (m/z)	Qualifier ion (m/z)
<i>cis</i> -Permethrin	26.98	25-34	183	60.5	48	168	165
<i>trans</i> -Permethrin	27.18	25-34	183	60.5	48	168	165
<i>cis</i> -DCCA-Me	12.22	10-15	187	61.8	1.05	151	123
<i>trans</i> -DCCA-Me	12.49	10-15	187	61.8	1.05	151	123
3-PBA-Me	18.59	15-25	228	75.3	43	196	195
<i>cis</i> - $^{13}\text{C}_6$ -Permethrin	26.97	25-34	189	60.5	48	174	/
<i>trans</i> - $^{13}\text{C}_2$ -DCCA-Me	12.35	10-15	190	61.8	1.05	154	/
$^{13}\text{C}_6$ -3-PBA-Me	18.59	15-25	234	75.3	43	202	/

Settings are provided for the derivatized form of *cis*-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethyl-(1-cyclopropane) carboxylic acid (*cis*-DCCA), *trans*-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethyl-(1-cyclopropane) carboxylic acid (*trans*-DCCA), 3-phenoxybenzoic acid (3-PBA) and their related internal standards. For *cis*-permethrin, *trans*-permethrin, *cis*- $^{13}\text{C}_6$ permethrin, 3-PBA-Me and $^{13}\text{C}_6$ -3-PBA-Me, the wave form type is of high resonance (high voltage), and is of low resonance for the other analytes (low voltage). -Me indicates a methyl ester derivative.

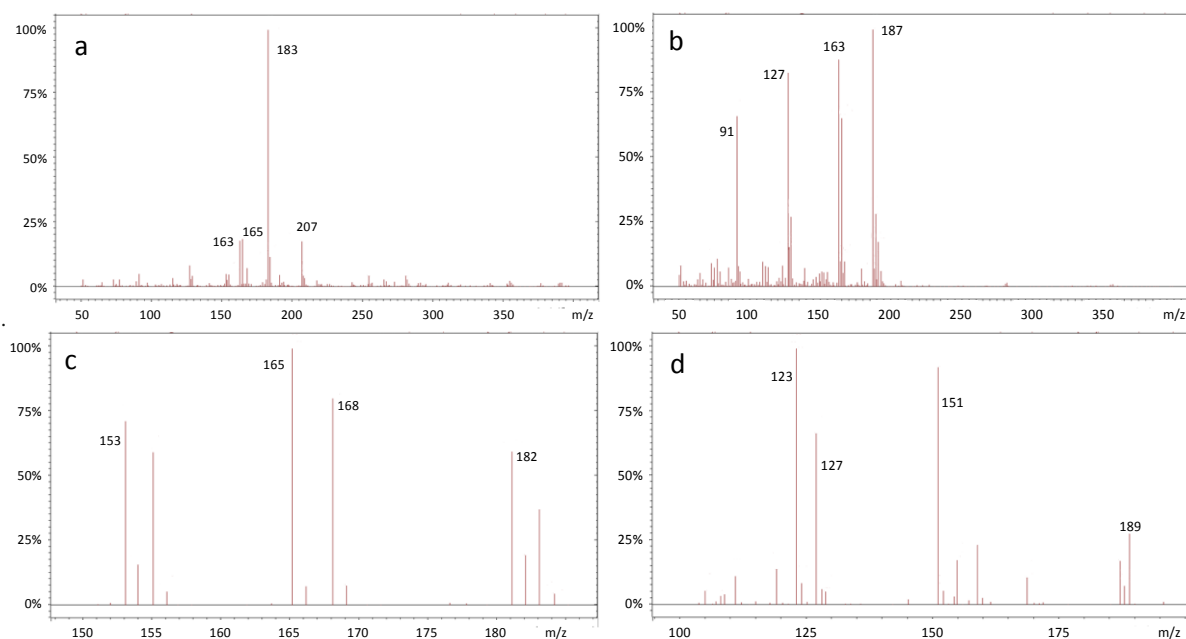


Figure 27. Examples of mass spectra obtained for target analytes: a) Full scan mass spectrum for *cis*-permethrin, b) full scan mass spectrum of derivatized *trans*-DCCA, c) daughter full scan spectrum obtained for the *m/z* 183 ion of *cis*-permethrin and d) daughter full scan spectrum obtained for the *m/z* ion 187 of derivatized *cis*-DCCA

Results and discussion

Method development and performances

Chromatographic separation

GC was selected since it allowed the *cis* and *trans* isomers and their respective metabolites to be separated (a representative chromatogram is displayed in Figure 26). The method was developed on the basis of the description of Corrion et al. [24]. The retention times of permethrin compounds were around 27 min, with a gap of 0.2 min between the *cis* and *trans* isomers, which was sufficient to achieve baseline resolution. Both derivatized *cis* and *trans* metabolites were also separated from each other and were eluted before the parent compounds (12.2 and 12.5 min, respectively). 3-PBA eluted at 18.6 min. The retention times are summarized in Table 20. The relative long retention times obtained for the permethrin enantiomers also allowed the target compounds to be better separated from the matrix interferences.

Choice of mass spectrometry parameters

An external source was used to reduce the rate of contamination from multiple sample injections. The detection parameters were optimized for each substance. The parent ion was first selected from the injection of a high-concentration standard. Then, the fragmentation patterns were determined by applying various energies. Daughter ions were chosen from the ions that provided the maximum intensities for the various fragments. Examples of mass spectra obtained during the method optimization are presented in Figure 27. For GC-MS/MS detection, according to the SANCO/12495/2011 guide [29], a minimum of two transitions from one parent ion is required to confirm the identification of a substance. Therefore, two transitions, one for the quantification and one as the qualifier, were determined. The acquisition was segmented into windows, corresponding to transitions of target components to increase the acquisition rate, the sensitivity and selectivity of the detection.

The MS parameters optimized for *cis*-permethrin, *trans*-permethrin and their derivatized metabolites are listed in Table 20.

Calibration procedure and linear range

The calibration standards were prepared following the extraction and derivation procedure used for fluids and organs [see "Biological fluids (blood, red blood cells, plasma)"]. As the method was intended to be applied to different biological matrices producing specific interferences, an isotopic labelled internal standard was added for each class of studied compound to take into account these phenomena. The calibration curves displayed good linearity in the 50-2,000 ng/mL range for *cis*-permethrin and *trans*-permethrin ($R^2 > 0.99$) and 3-PBA ($R^2 > 0.99$). For *cis*-DCCA and *trans*-DCCA, linearity ranged from 25 and 1,000 ng/mL ($R^2 = 0.98$ for *cis*-DCCA and $R^2 = 0.99$ for *trans*-DCCA).

The accuracy and precision of the analytical method were evaluated at the concentrations of 100 and 600 ng/mL for *cis*-permethrin, *trans*-permethrin, 3-PBA and the mixture of *cis*-DCCA and *trans*-DCCA. These concentrations were analysed every ten samples per day to evaluate intraday accuracy and precision, with a final number of samples between ten and twelve. Interday accuracy and precision were determined by comparing analyses performed over three different days (n between 32 and 36).

Tableau 21. Intraday (n= 10 - 12) and interday (n = 32 - 36) accuracy and precision of the analytical method at 100 and 600 ng/mL doses of *cis*-permethrin, *trans*-permethrin, 3-PBA and a mixture of *cis*-DCCA and *trans*-DCCA in methanol

Compound	Accuracy (%)	Precision (%)
Intraday comparisons		
<i>cis</i> -Permethrin	12 ± 7	11 ± 6
<i>trans</i> -Permethrin	10 ± 6	8 ± 1
<i>cis</i> -DCCA	13 ± 9	11 ± 5
<i>trans</i> -DCCA	11 ± 11	10 ± 4
3-PBA	12 ± 10	9 ± 6
Interday comparisons		
<i>cis</i> -Permethrin	11 ± 8	7 ± 3
<i>trans</i> -Permethrin	15 ± 16	12 ± 3
<i>cis</i> -DCCA	15 ± 10	12 ± 6
<i>trans</i> -DCCA	16 ± 11	19 ± 9
3-PBA	11 ± 7	8 ± 3

Tableau 22. Recovery (%) after extraction in the different matrices (n = 3) spiked with a 500 ng/mL dose of *cis*-permethrin, *trans*-permethrin, *cis*- and *trans*-DCCA and 3-PBA

Compound	Blood	Plasma	RBCs	Liver
<i>cis</i> -Permethrin	88 ± 7	99 ± 1	90 ± 13	97 ± 15
<i>trans</i> -Permethrin	109 ± 7	99 ± 6	106 ± 18	109 ± 16
<i>cis</i> -DCCA	85 ± 14	101 ± 5	113 ± 5	98 ± 24
<i>trans</i> -DCCA	102 ± 2	111 ± 18	120 ± 15	132 ± 24
3-PBA	76 ± 5	79 ± 9	76 ± 4	71 ± 8

Compound	Faeces	Testes	Brain	Muscle	Kidney	Fat
<i>cis</i> -Permethrin	65 ± 5	112 ± 10	105 ± 8	96 ± 9	98 ± 5	91 ± 6
<i>trans</i> -Permethrin	105 ± 11	131 ± 24	116 ± 49	121 ± 20	128 ± 3	102 ± 2

All values are expressed as the mean ± the standard deviation. Recovery was calculated as the amount of compound in the different matrices compared with the expected concentration. RBCs : red blood cells.

Accuracy was the mean of the accuracy of each sample, calculated by $(| \text{measured concentration} - \text{added concentration} | / \text{added concentration}) \times 100$. Precision was given by the standard deviation divided by the mean of the detected concentration. The results are reported in Table 21. The intraday comparisons provided results for all components in a range between 10 and 13 % for accuracy and in a range between 8 and 11 % for precision. The interday comparisons provided accuracy values between 11 and 16 % and precision between 7 and 19 %.

Sample preparation and method performances for biological fluids (blood, red blood cells, plasma), organs and faeces

To simplify the analytical protocol and take advantage of the selective MS/MS detection, a single sample preparation technique was developed for most of the target matrices and analytes. Thus, the method used by Corrión et al. [24] for the analysis of umbilical cord and maternal blood for pyrethroids (but not permethrin) and their metabolites was adapted for this study. The method proved to be compatible with all matrices tested except fat. Table 22 presents the recoveries determined for the extraction of the compounds studied in each matrix. The derivatization step did not influence the recovery of the parent compounds; therefore, the extraction procedure was satisfactory for all target analytes since all recovery factors were within the 65 – 132 % range. In light of these results, no correction was applied for the compounds studied. Representative chromatograms obtained after extraction of *cis*-permethrin and its metabolites in samples are shown in Figure 28.

Selection of extraction method for fat

Preliminary tests (results not reported) demonstrated that the extraction method used for organs and faeces did not provide satisfactory results for the analysis of fat. Indeed, the extracted lipids generated severe interferences during the chromatographic analysis. An extraction method based on the standard NF EN 1528 [27] was therefore selected. Metabolites were not quantified in fat, so the method was only optimized for analysis *cis*- permethrin and *trans*-permethrin.

Two methods of purification were considered [details for the extraction and purification steps are provided in “Organs (brain, muscle, testes, liver, kidney), fat and faeces”]. The method was tested with samples containing no fat to verify the recovery step of the method and then with spiked fat samples. Purification with C₁₈ provided recoveries at 109 % and 114 % without and with the matrix. Purification with Strata X-AW also provided satisfactory results, as the recoveries were of 104 % and 118 % without and with the matrix, respectively.

The results obtained either with C₁₈ and Strata X –AW sorbents yielded acceptable recoveries. Strata X-AW sorbent was chosen since the chromatograms obtained contained fewer interfering peaks than those obtained with the C₁₈ sorbent.

A representative chromatogram for fat extraction is displayed in Figure 28.

Limits of quantification

The limits of quantification (LOQ) were determined as a signal-to-noise ratio of 10. The LOQ were established in each matrix by considering the results of the toxicokinetic experiments.

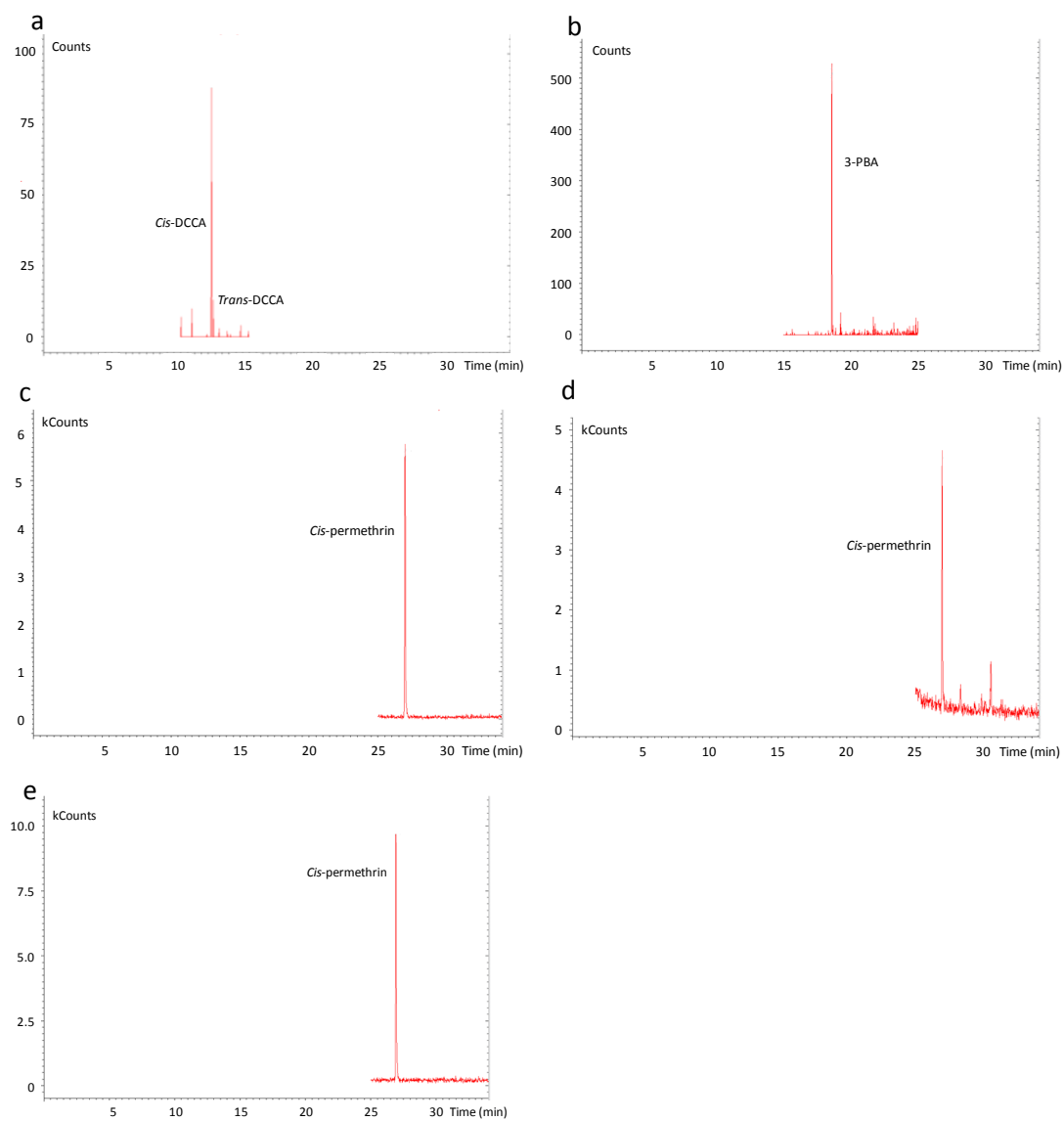


Figure 28. Chromatograms obtained after extraction in plasma for (a) *cis*-DCCA and *trans*-DCCA, (b) 3-PBA and (c) *cis*-permethrin, and for *cis*-permethrin in (d) muscle and (e) fat

In fluids, the LOQ were at a 50 ng/mL level for the parent compounds and 3-PBA and at 25 ng/mL for *cis*-DCCA and *trans*-DCCA. For solid matrices excluding fat, the LOQ were ranged from 50 ng/g for muscle to 100 ng/g for brain and testes for both *cis*-permethrin and *trans*-permethrin. In fat, because of the purification step, which produced a low level of noise, a LOQ of 50 ng/g was obtained.

The method and detection chosen generally provided enough sensitivity and selectivity to avoid the necessity of developing any further concentration or purification steps for most matrices tested, which would have complicated the analytical process. However, to increase sensitivity, extracts could be concentrated by nitrogen evaporation to reduce the 1-mL of volume extract to 200 μ L (or even further). The limits of quantification could then be reduced by a factor of 5. To prevent the accumulation of non-volatile interferences from the extract in the analytical system (injector, column or mass spectrometer parts), this preconcentration process was performed only when needed, i.e., when no response was obtained with the standard protocol and a low amount of target compounds were expected, e.g. in testes.

Application of permethrin analysis to toxicokinetic studies in rats

Formic acid to inhibit metabolic reactions in blood

cis-Permethrin and *trans*-permethrin are metabolized in the liver and intestines but also in the blood. The use of formic acid to inhibit metabolic reactions after sampling was tested. To that end, blank matrices were spiked with *cis*-permethrin and *trans*-permethrin. For samples treated with 1 % of formic acid, the recoveries for *cis*-permethrin and *trans*-permethrin were 76 ± 6 % and 85 ± 13 % in blood, 67 ± 5 % and 81 ± 7 % in plasma, 63 ± 12 % and 84 ± 22 % in RBCs, respectively. Without formic acid, the recoveries were at 50 ± 7 % and 21 ± 6 % in blood, 45 ± 3 % and 1 ± 1 % in plasma, 53 ± 16 % and 28 ± 5 % in RBCs, respectively. Lower recoveries were obtained without formic acid.

Similar results were observed with biological samples collected from two rats exposed to a dose of 5 mg/kg of bodyweight or a dose of 20 mg/kg of bodyweight. After an oral administration of a 5 mg/kg dose, the concentration of *trans*-permethrin was measured at 0.10 μ g/mL in a blood sample with formic acid whereas it was not detected in a blood sample without formic acid. For *cis*-permethrin, formic acid resulted in higher measured concentrations (0.34 ± 0.11 μ g/mL) as compared with the concentrations (0.16 ± 0.04 μ g/mL) obtained without formic acid. In plasma, 2 h after a 20 mg/kg dose of *trans*-permethrin or *cis*-permethrin had been administered, without formic acid, *trans*-permethrin was not detected, and *cis*-permethrin was determined at a concentration of only 0.60 ± 0.50 μ g/mL. When formic acid was added to samples collected at the same time point, the measured concentrations were 0.41 μ g/mL and 1.09 ± 1.14 μ g/mL, respectively. Leng et al. [21] also observed that the addition of formic acid improved storage stability of permethrin in plasma. These results are consistent with their conclusions and confirmed the need to add 1 % formic acid to blood samples to inhibit permethrin metabolism after sampling.

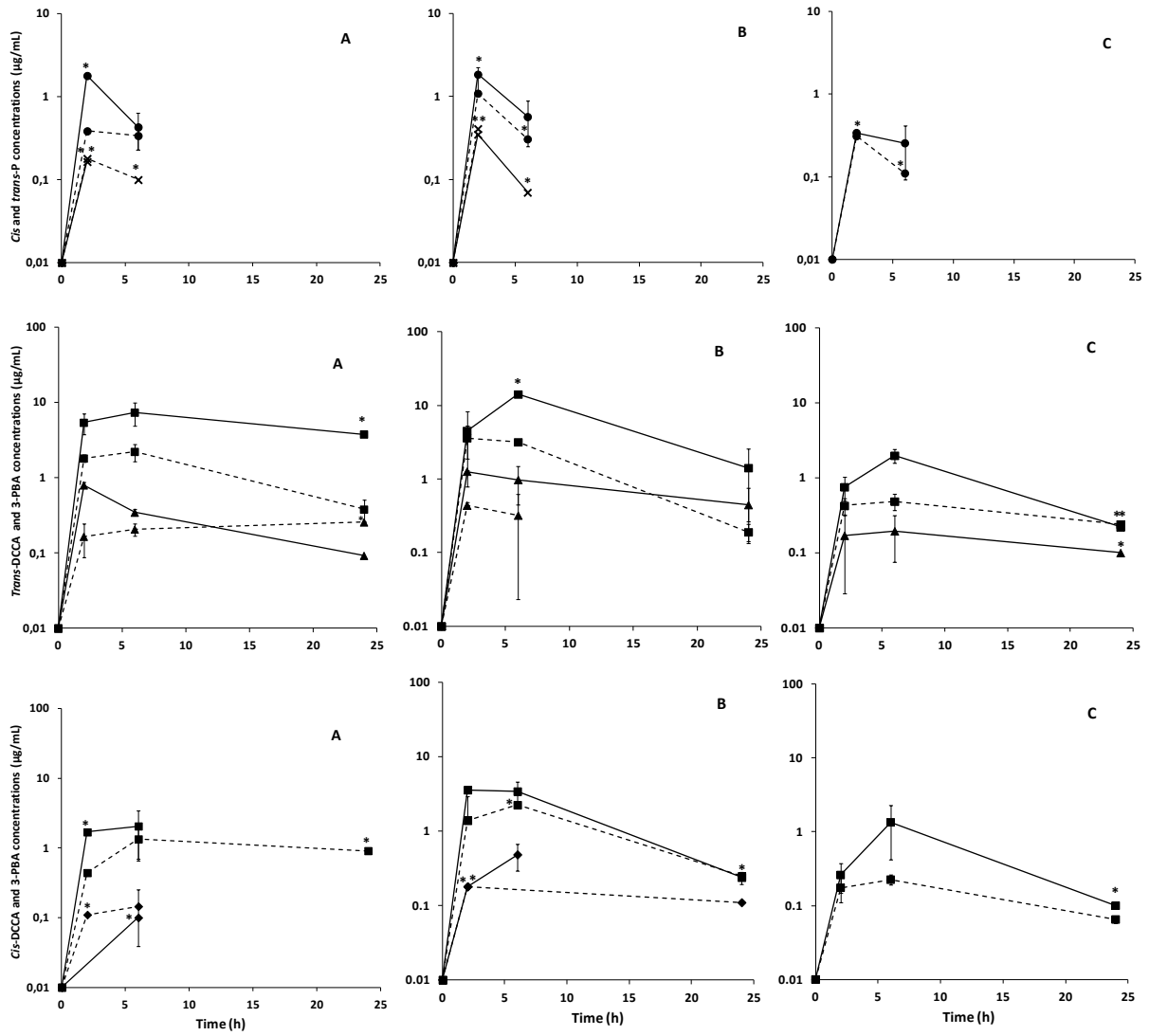


Figure 29. *cis*-Permethrin (*cis*-P) (dots), *trans*-permethrin (*trans*-P) (crosses), 3-PBA (squares), *cis*-DCCA (diamonds) and *trans*-DCCA (triangles) concentration versus time profiles in blood (A), plasma (B) and red blood cells (C) after an oral administration of 5 mg/kg (dashed line) and 20 mg/kg (solid line) doses of *cis*-permethrin or *trans*-permethrin. Mean values \pm standard deviation (SD) for $n = 2$ at each time point except for point marked with an asterisk ($n = 1$)

Toxicokinetic study

The analytical method was applied to blood, plasma, RBCs and tissue samples collected in rats during the toxicokinetic study with administration doses of 5 and 20 mg/kg. The concentration versus time profiles of the different compounds in blood and plasma with formic acid, RBCs and tissues concentrations are presented in Figures 29, 30 and 31.

In fluids, the maximum concentration was observed between 2 and 6 h after the administration of the parent compounds and the metabolites (Figure 29). *trans*-Permethrin was detected only at the 2-h time point, whereas *cis*-permethrin was also detected at 6 h. At equivalent doses, *cis*-permethrin was found at higher levels than *trans*-permethrin, suggesting that *trans*-permethrin has a higher metabolic rate, as has been observed in other studies [18]. This is also supported by the higher blood concentration of the metabolite 3-PBA, $7.37 \pm 2.50 \mu\text{g/mL}$ at 6 h after the administration of a 20 mg/kg dose of *trans*-permethrin, compared with $1.69 \mu\text{g/mL}$ in the same condition following *cis*-permethrin administration. Moreover, the maximum concentration of 3-PBA is higher than the maximum of *cis*-DCCA and *trans*-DCCA, e.g., $2.22 \pm 0.57 \mu\text{g/mL}$ for 3-PBA and $0.21 \pm 0.04 \mu\text{g/mL}$ for *trans*-DCCA in blood after the administration of a 5 mg/kg dose of *trans*-permethrin. The concentrations of the different compounds are similar in blood and plasma, whereas the concentrations in RBC are lower, especially for the *cis*-permethrin and *trans*-permethrin metabolites. *cis*-Permethrin was detected and quantified in all tissues at 2 and 6 h after the administration of each dose, except in testes, where it was determined only for a dose of 20 mg/kg bodyweight (Figure 30). The maximum concentration was generally observed at 6 h after administration in most of the tissues (brain, testes, muscle, fat). For these matrices, *trans*-permethrin was detected only in fat, and this for both doses (Figure 31). In faeces, high levels of *cis*-permethrin and *trans*-permethrin were measured. On average, 25 % of the administered dose of *trans*-permethrin and 38 % of the administered dose of *cis*-permethrin were excreted via faeces.

Our data did not allow us to draw a conclusion about the linearity of the kinetics of *cis*-permethrin and *trans*-permethrin under the dose regimen. For *cis*-permethrin, the ratios of the concentrations measured in fluids and organs for the low dose over those measured for the high dose ranged between 0.9 in fat to 3.5 in kidneys. However, these ratios should be taken with caution because of the low number of data points collected and the large interindividual variability observed between the two rats in each group. The percentage of permethrin excreted in faeces was independent of the quantity administered for both isomers.

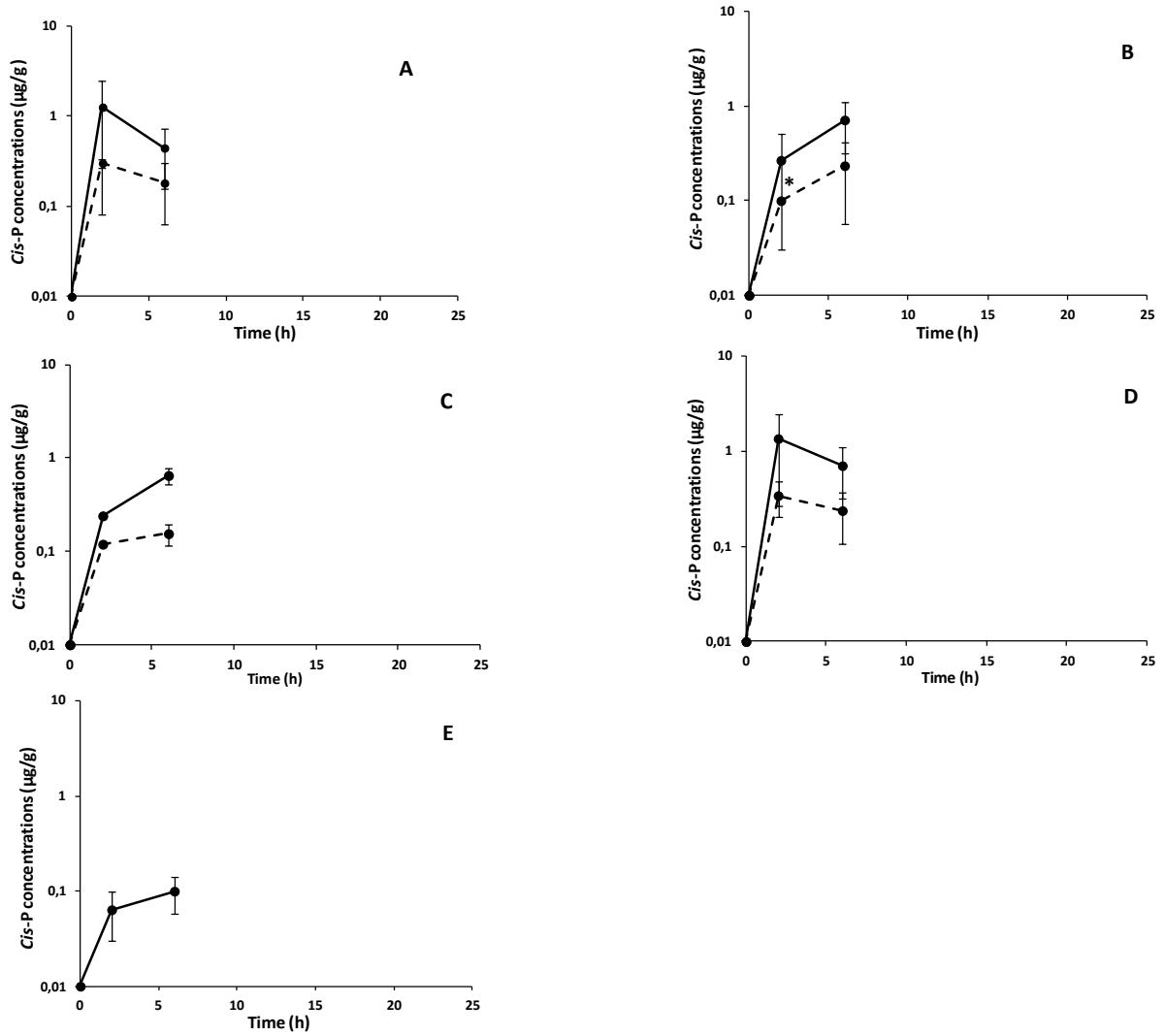


Figure 30. *cis*-Permethrin (*cis*-P) concentration versus time profiles in liver (A), brain (B), muscle (C), kidney (D) and testes (E) after an oral administration of 5 mg/kg (*dashed line*) and 20 mg/kg (*solid line*) doses of *cis*-permethrin. Mean values \pm SD for $n = 2$ at each time-point except for point marked with an *asterisk* ($n = 1$)

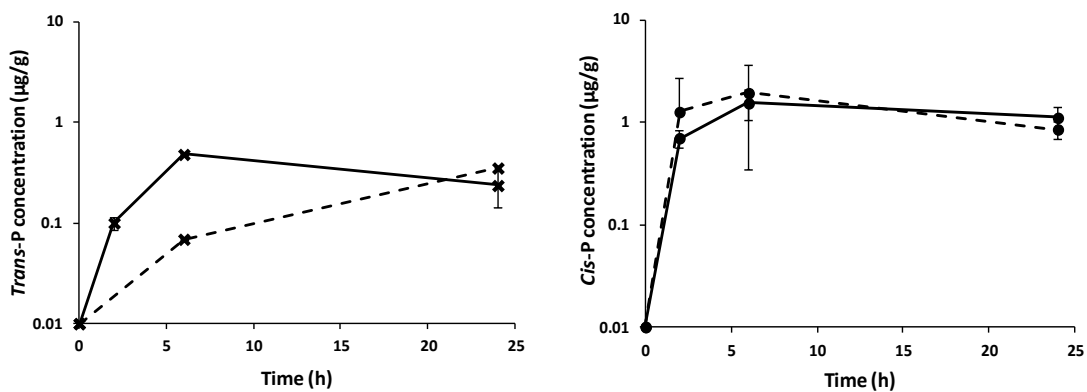


Figure 31. *cis*-Permethrin (*cis*-P) and *trans*-permethrin (*trans*-P) concentration versus time profiles in fat after an oral administration of 5 mg/kg (*dashed line*) and 20 mg/kg (*solid line*) of *cis*-permethrin or *trans*-permethrin. Mean values \pm SD for $n = 2$ at each time point

Conclusion

An analytical method for the simultaneous determination of *cis*- and *trans*-permethrin and their associated metabolites (*cis*-DCCA, *trans*-DCCA and 3-PBA) in several organs, fluids and faeces in rats was developed. Detection by ion trap MS/MS mode proved to provide sufficient sensitivity and selectivity to make possible measurement in a real matrix with easy-to-use methods. The methods developed were successfully applied to samples collected in toxicokinetic studies. Our observations are consistent with existing knowledge of *cis*-permethrin and *trans*-permethrin toxicokinetics, i.e., substantial elimination in faeces, rapid elimination from tissues, accumulation of both *cis*-permethrin and *trans*-permethrin in fat because of their lipophilic properties ($\log K_{ow} = 6.5$) and a higher clearance rate of the *trans* isomer compared with the *cis* isomer.

Acknowledgements

This work was supported by La Fondation UTC pour l'Innovation (Project ToxOnChip) of the University of Technology of Compiègne and the French Ministry of Ecology and Sustainable Development.

References

1. Environmental Protection Agency (U.S. EPA) (2007) Permethrin & Resmethrin (Pyrethroids) Toxicity and Exposure Assessment for Children's Health (TEACH) Chemical Summary.
2. Wei BN, Mohan KR, Weisel CP (2012) Exposure of flight attendants to pyrethroid insecticides on commercial flights: Urinary metabolite levels and implications. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 215 (4):465-473.
3. Morgan MK, Sheldon LS, Croghan CW, Jones PA, Chuang JC, Wilson NK (2007) An observational study of 127 preschool children at their homes and daycare centers in Ohio: Environmental pathways to cis- and trans-permethrin exposure. *Environmental Research* 104 (2):266-274.
4. Feo ML, Eljarrat E, Barcelo D (2010) Determination of pyrethroid insecticides in environmental samples. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 29 (7):692-705.
5. Corcellas C, Feo ML, Torres JP, Malm O, Ocampo-Duque W, Eljarrat E, Barcelo D (2012) Pyrethroids in human breast milk: Occurrence and nursing daily intake estimation. *Environment International* 47 (0):17-22.
6. Jin YX, Liu JW, Wang LG, Chen RJ, Zhou C, Yang YF, Liu WP, Fu ZW (2012) Permethrin exposure during puberty has the potential to enantioselectively induce reproductive toxicity in mice. *Environment International* 42:144-151.
7. Meeker JD, Barr DB, Hauser R (2008) Human semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary metabolites of pyrethroid insecticides. *Human Reproduction* 23 (8):1932-1940.
8. Wolansky MJ, Harrill JA (2008) Neurobehavioral toxicology of pyrethroid insecticides in adult animals: A critical review. *Neurotoxicology and Teratology* 30 (2):55-78.
9. Zhang SY, Ito Y, Yamanoshita O, Yanagiba Y, Kobayashi M, Taya K, Li C, Okamura A, Miyata M, Ueyama J, Lee CH, Kamijima M, Nakajima T (2007) Permethrin may disrupt testosterone biosynthesis via mitochondrial membrane damage of leydig cells in adult male mouse. *Endocrinology* 148 (8):3941-3949.
10. Zhang S-Y, Ueyama J, Ito Y, Yanagiba Y, Okamura A, Kamijima M, Nakajima T (2008) Permethrin may induce adult male mouse reproductive toxicity due to cis isomer not trans isomer. *Toxicology* 248 (2-3):136-141.
11. Ross MK, Borazjani A, Edwards CC, Potter PM (2006) Hydrolytic metabolism of pyrethroids by human and other mammalian carboxylesterases. *Biochemical Pharmacology* 71 (5):657-669.
12. Soderlund DM, Clark JM, Sheets LP, Mullin LS, Piccirillo VJ, Sargent D, Stevens JT, Weiner ML (2002) Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology* 171 (1):3-59.
13. Tornero-Velez R, Davis J, Scollon EJ, Starr JM, Setzer RW, Goldsmith M-R, Chang DT, Xue J, Zartarian V, DeVito MJ, Hughes MF (2012) A Pharmacokinetic Model of cis- and trans-Permethrin

Disposition in Rats and Humans With Aggregate Exposure Application. *Toxicological Sciences* 130 (1):33-47.

14. Anadon A, Martinezlarranaga MR, Diaz MJ, Bringas P (1991) Toxicokinetics of Permethrin in the Rat. *Toxicology and Applied Pharmacology* 110 (1):1-8.

15. Crow JA, Borazjani A, Potter PM, Ross MK (2007) Hydrolysis of pyrethroids by human and rat tissues: Examination of intestinal, liver and serum carboxylesterases. *Toxicology and Applied Pharmacology* 221 (1):1-12.

16. Nakamura Y, Sugihara K, Sone T, Isobe M, Ohta S, Kitamura S (2007) The in vitro metabolism of a pyrethroid insecticide, permethrin, and its hydrolysis products in rats. *Toxicology* 235 (3):176-184.

17. Choi J, Rose RL, Hodgson E (2002) In vitro human metabolism of permethrin: the role of human alcohol and aldehyde dehydrogenases. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 74 (3):117-128.

18. Scollon EJ, Starr JM, Godin SJ, DeVito MJ, Hughes MF (2009) In Vitro Metabolism of Pyrethroid Pesticides by Rat and Human Hepatic Microsomes and Cytochrome P450 Isoforms. *Drug Metabolism and Disposition* 37 (1):221-228.

19. Starr JM, Scollon EJ, Hughes MF, Ross DG, Graham SE, Crofton KM, Wolansky MJ, DeVito MJ, Tornero-Velez R (2012) Environmentally Relevant Mixtures in Cumulative Assessments: An Acute Study of Toxicokinetics and Effects on Motor Activity in Rats Exposed to a Mixture of Pyrethroids. *Toxicological Sciences* 130 (2):309-318.

20. Du JJ, Yan HY, She DD, Liu BM, Yang GL (2010) Simultaneous determination of cypermethrin and permethrin in pear juice by ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography. *Talanta* 82 (2):698-703.

21. Leng G, Kuhn KH, Idel H (1997) Biological monitoring of pyrethroids in blood and pyrethroid metabolites in urine: Applications and limitations. *Science of the Total Environment* 199 (1-2):173-181.

22. Schettgen T, Koch HM, Drexler H, Angerer J (2002) New gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of urinary pyrethroid metabolites in environmental medicine. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 778 (1-2):121-130.

23. Baker SE, Olsson AO, Barr DB (2003) Isotope dilution high-performance liquid chromatography-tandem mass Spectrometry method for quantifying urinary metabolites of synthetic pyrethroid insecticides. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 46 (3):281-288.

24. Corrion ML, Ostrea EM, Bielawski DM, Posecion NC, Seagraves JJ (2005) Detection of prenatal exposure to several classes of environmental toxicants and their metabolites by gas chromatography-mass spectrometry in maternal and umbilical cord blood. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 822 (1-2):221-229.

25. Leng G, Gries W (2005) Simultaneous determination of pyrethroid and pyrethrin metabolites in human urine by gas chromatography-high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 814 (2):285-294.

26. Le Grand R, Dulaurent S, Gaulier JM, Saint-Marcoux F, Moesch C, Lachatre G (2012) Simultaneous determination of five synthetic pyrethroid metabolites in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Application to 39 persons without known exposure to pyrethroids. *Toxicology Letters* 210 (2):248-253.

27. Standard NF EN 1528- Fatty food. Determination of pesticides and polychlorinated biphenyls (PCBs). (1997).

28. Rawn DFK, Judge J, Roscoe V (2010) Application of the QuEChERS method for the analysis of pyrethrins and pyrethroids in fish tissues. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397 (6):2525-2531.

29. EU Reference Laboratories (EURLs) (2012) Document No. SANCO/12495/2011: Method Validation & Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food & Feed.

II. DEVELOPPEMENT D'UN MODELE PBPK DE LA PERMETHRINE ET DE SES METABOLITES CHEZ LE RAT

Sera soumis avant fin 2014 à *Toxicology Applied Pharmacology*

Un modèle PBPK chez le rat de la perméthrine et de quatre métabolites a été développé afin de lier la cinétique du composé toxique parent à celles des biomarqueurs d'exposition. Pour calibrer le modèle, des expériences *in vivo* chez le rat ont été mises en place. Le modèle PBPK de la perméthrine a ensuite pu être vérifié sur des données de cinétique d'un mélange *cis/trans* de perméthrine.

Les expériences *in vivo* ont consisté à administrer séparément la dose de 25 mg/kg de *cis*- ou *trans*-perméthrine à des rats mâles Sprague-Dawley. Sang, foie, cerveau, graisses, muscles, reins, testicules, urines et fèces étaient isolés. Les isomères *cis* et *trans*-perméthrine ont été dosés dans toutes les matrices, les métabolites *cis* et *trans*-DCCA uniquement dans le sang, le foie, les fèces et les urines et les métabolites 3-PBA et 4'-OH-PBA dans les urines et les fèces. La structure du modèle PBPK de la perméthrine est basée sur celle des modèles pyréthrinoïdes précédemment publiés, avec l'ajout de nouveaux organes tels que les testicules et les muscles. Le métabolisme de la perméthrine a lieu dans les intestins, le sang et le foie. Le modèle PBPK de la perméthrine est relié au niveau du foie à un modèle PBPK réduit du DCCA et à un modèle empirique du 3-PBA et 4'-OH-PBA. La vitesse de formation des métabolites est estimée sous forme de fraction de la clairance totale du composé parent. Les paramètres toxicocinétiques (coefficient de partage et de perméabilité, constantes de métabolisme et d'élimination) du composé parent et des métabolites sont estimés dans un contexte Bayésien.

Le modèle calibré prédit des profils cinétiques en accord avec les concentrations observées dans l'ensemble des matrices. Une surestimation des concentrations de la *trans*-perméthrine dans les graisses est observée. De manière générale, les caractéristiques de la cinétique de la perméthrine sont retrouvées (large distribution dans les graisses, clairance hépatique de l'isomère *cis* 2,6 fois plus lente que celle de la forme *trans*). Cependant, aucune accumulation de la perméthrine dans les muscles n'a été retrouvée. La vitesse de formation du DCCA équivaut respectivement à 22 et 52 % de la clairance totale *in vivo* de la *cis*- et *trans*-perméthrine. Cette fraction est 10 à 40 fois plus faible pour le 3-PBA. Notre modèle PBPK calibré sur les isomères séparés de la perméthrine a permis de reproduire les profils cinétiques obtenus en condition de mélange.

Le modèle PBPK chez le rat ainsi établi relie l'exposition externe et interne des composés parents aux concentrations en métabolites dans les sites d'excrétion. Il caractérise au niveau *in vivo* la relation parent-métabolite pour la perméthrine.

Development of a rat PBPK model of *cis*- and *trans*-permethrin and their metabolites *cis*- or *trans*-DCCA, 3-PBA and 4'-OH-PBA

Marie-Emilie Willemin^{1,2}, Sophie Desmots³, François Lestremou⁴, Eric Leclerc², Christian Moesch⁵, Céline Brochot^{*1}

¹ Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), Unité Modèles pour l'Ecotoxicologie et la Toxicologie (METO), Parc ALATA BP2, 60550 Verneuil en Halatte, France

² Université de Technologie de Compiègne, CNRS UMR 7338, Laboratoire de Biomécanique et Bio ingénierie, France

³ Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), Unité Toxicologie Expérimentale (TOXI), Parc ALATA BP2, 60550 Verneuil en Halatte, France

⁴ Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), Unité Innovation pour la Mesure (NOVA), Parc ALATA BP2, 60550 Verneuil en Halatte, France

⁵ Centre Hospitalo-Universitaire de Limoges, Service de Pharmacologie et de Toxicologie – Pharmacovigilance, 2, avenue Martin Luther King, 87042 Limoges, France

Sera soumis avant fin 2014 à *Toxicology Applied Pharmacology*

Abstract

Permethrin, a pyrethroid insecticide widely used in house treatments, is suspected to induce neuronal and hormonal disturbances in humans. The large exposure of the populations was confirmed by the detection of urinary metabolites of permethrin and other pyrethroids in biomonitoring studies. Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) models were previously developed for deltamethrin, a pyrethroid with one single chemical configuration, or permethrin as a mixture of the two isomers *cis* and *trans*. In this work, we propose to extend the PBPK model developed for permethrin to include new compartments such as the kidneys and the testes and to couple the permethrin model to models for three urinary metabolites, *cis*- and *trans*-3-(2,2 dichlorovinyl)-2,2-dimethyl-(1-cyclopropane) carboxylic acid (*cis*- and *trans*-DCCA), 3-phenoxybenzoic acid (3-PBA) and 4'-OH-phenoxybenzoic acid (4'-OH-PBA). New *in vivo* experiments in rats were also performed to determine the toxicokinetics of the two isomers separately since *in vitro* studies suggested a potential interaction between them. Key parameters of the toxicokinetics of permethrin (metabolic rates, partition coefficients...) were estimated in a Bayesian framework. The hepatic clearances in rats were estimated to 2.3 and 4.3 L/h/kg for respectively *cis*- and *trans*-permethrin and a large accumulation in fat was observed. DCCA and 4'-OH-PBA were largely recovered in urine compared to 3-PBA. The values of parameters and concentrations were consistent with previous works. The developed PBPK model linking urinary biomarkers concentrations to external and internal dose of exposure can be extrapolated to a human PBPK model to be used in biomonitoring framework.

Keywords: PBPK models, *cis/trans*-permethrin, 3-phenoxybenzoic acid, *cis*- and *trans*-3-(2,2 dichlorovinyl)-2,2-dimethyl-(1-cyclopropane) carboxylic acid, Bayesian calibration

Introduction

Pyrethroids are widely used in house treatments, agriculture or medicine (Stout *et al.*, 2009; US EPA, 2011). Their consumption increased recently probably due to some restrictions on the use of other insecticides such as organophosphates and organochlorates. Several biomonitoring studies confirmed the large exposure of the human population by detecting urinary metabolites of pyrethroids, used as biomarkers of exposure (Heudorf *et al.*, 2006; Barr *et al.*, 2010; Ueyama *et al.*, 2010; Morgan, 2012). Among pyrethroids, permethrin (3-phenoxybenzyl (1*RS*,3*RS*;1*RS*,3*SR*)-*cis,trans*-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclo-propanecarboxylate) is one of the most commonly used, especially in house treatments (US EPA, 2005; Stout *et al.*, 2009). With four stereoisomers arising from the two chiral carbons on the cyclopropane rings, permethrin is usually sold as a mixture of the two isomers *cis/trans* (40:60; 80:20; 25:75). Permethrin acts on the nervous system of insects by interfering with sodium channels to disrupt the function of neurons (Soderlund *et al.*, 2002). In mammals, permethrin is suspected to induce disturbances on the neuronal and hormonal systems. Syndrome T (aggressive sparring, fine tremors) (Verschoyle and Aldridge, 1980; Wolansky and Harrill, 2008) and reproductive modifications, especially on testosterone levels (Zhang *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008; Jin *et al.*, 2012) were observed in rats after acute and chronic exposures. In humans, reported adverse effects are skin irritation, paraesthesia or headaches depending of the exposure routes (dermal or oral) (Lequesne *et al.*, 1981; Flannigan *et al.*, 1985; He *et al.*, 1989; Gotoh *et al.*, 1998; Bradberry *et al.*, 2005). Modifications of the sperm quality were also associated to detection of urinary pyrethroids metabolites (Meeker *et al.*, 2008; Young *et al.*, 2013; Imai *et al.*, 2014).

The kinetic of permethrin in rats was previously determined *in vivo* or on *in vitro* supports (Gaughan *et al.*, 1977; Anadon *et al.*, 1991; Scollon *et al.*, 2009). Once absorbed with an oral bioavailability of about 60%, permethrin is distributed in the tissues/organs, is accumulated in fatty tissues due to its lipophilic properties (log P = 6.5), and is rapidly transformed into metabolites such as *cis*- and *trans*-3-(2,2 dichlorovinyl)-2,2-dimethyl-(1-cyclopropane) carboxylic acid (*cis*- and *trans*-DCCA), 3-phenoxybenzoic acid (3-PBA) and 4'-OH-phenoxybenzoic acid (4'-OH-PBA) (Anadon *et al.* 1991) (ATSDR, 2003; Mirfazaelian *et al.*, 2006; Tornero-Velez *et al.*, 2012). The persistence of *cis*-permethrin three times longer compared to the *trans* isomer explains its higher toxicity (Nakamura *et al.*, 2007; Scollon *et al.*, 2009).

A physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model for permethrin was previously developed in rats and extrapolated to humans to link the exposure dose to the internal levels in brain (Tornero-Velez *et al.*, 2012). A simple model for DCCA was associated to the PBPK model of the parent compound to predict the urinary elimination of the metabolite and to link this biomarker of exposure to the external exposure dose. The model of permethrin and DCCA was calibrated on kinetic results in rats orally dosed with respectively a commercial mixture of the *cis* and *trans* isomers (40:60) (Tornero-Velez *et al.*, 2012) and radiolabeled permethrin (Gaughan *et al.*, 1977). The PBPK model of permethrin once extrapolated to humans was already used to predict urine metabolite profiles and internal dose of exposure to permethrin for flight attendants to assess of the potential health risks during the disinfection (Wei *et al.*, 2013). A recent study consisted in exposing rats to a mixture of pyrethroids and quantifying simultaneously the kinetic of the parent compounds and metabolites in target organs (Starr *et al.*, 2012; Starr *et al.*, 2014). No quantification of metabolites in urine was described. As pyrethroids share common metabolites (Figure 32), the link between parent compound and metabolites should be established first with separate form of pyrethroids. Indeed the

assignment of a biomarker in urine to the exposure to a specific pyrethroid remains actually difficult. Link between biomarkers DCCA and 3-PBA and permethrin was previously established with a non physiological approach, limiting the possibilities to extrapolate the models to other situations of exposure (Fortin *et al.*, 2008; Côté *et al.*, 2014). In this study we propose to associate the quantification of the internal dose of exposure to permethrin to the recovered amounts of metabolites in urine. Thus we developed in a Bayesian framework a PBPK model of the separate isomer *cis* and *trans* of permethrin associated to the prediction of kinetic of metabolites specific to permethrin (*cis*- and *trans*-DCCA) and common to pyrethroids (PBA and 4'-OH-PBA) (Scollon *et al.*, 2009; Ueyama *et al.*, 2010).

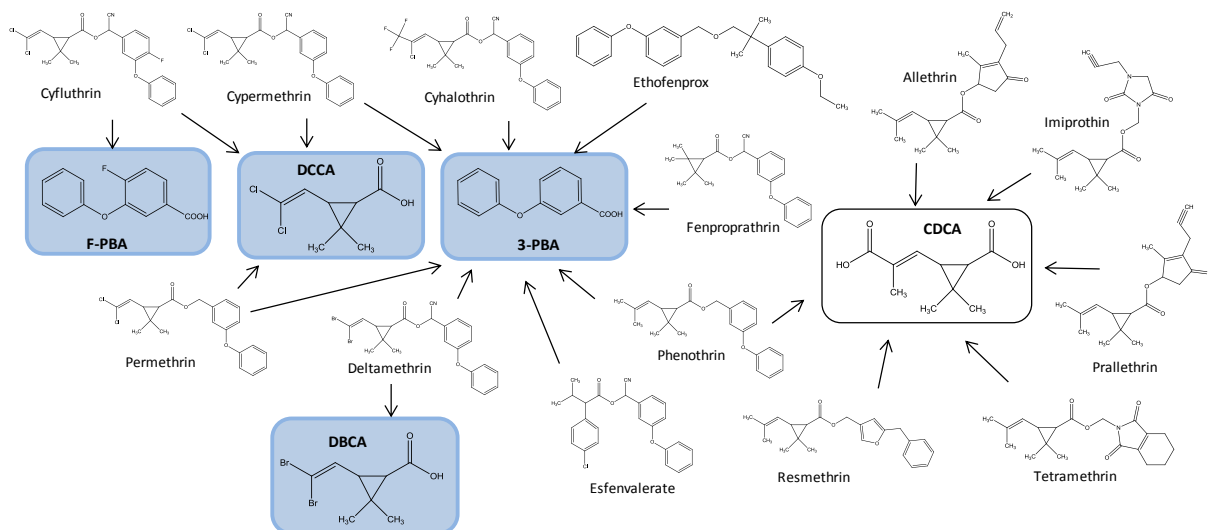


Figure 32. Pyrethroids and their metabolites (framed compounds) commonly dosed in biomonitoring studies. This figure is adapted from Starr *et al.* (2012)

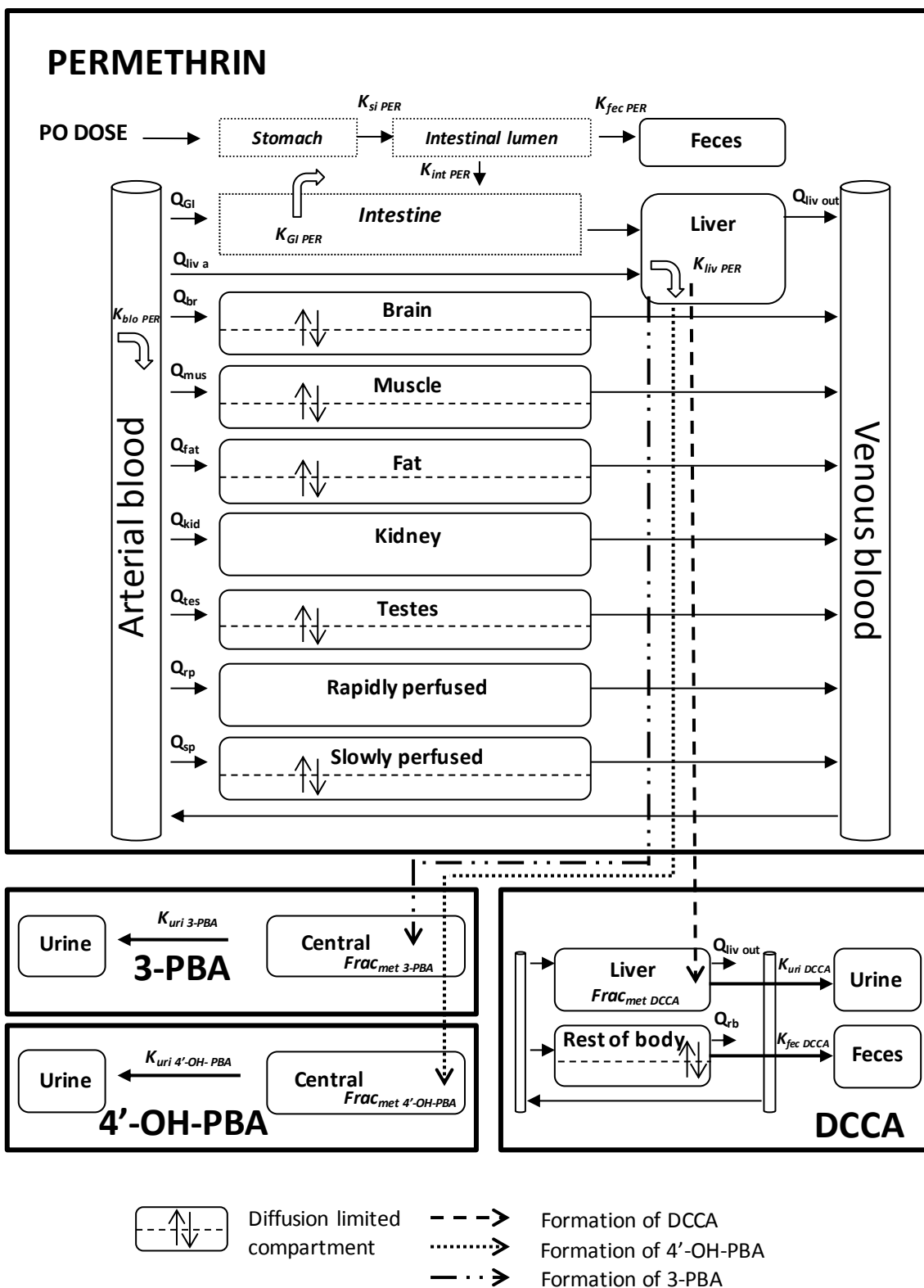


Figure 33. PBPK model of *cis*- and *trans*-permethrin and their metabolites *cis*- and *trans*-DCCA, 3-PBA and 4'-OH-PBA with an oral exposure. Distribution in brain, muscle, fat, testes and slowly perfused tissues of parent compounds and in rest of body of DCCA is represented as diffusion limited compartment and distribution in other organ as flow limited compartments. 3-PBA, DCCA, 4'-OH-PBA are formed in liver.

Experimental

Chemicals

Cis-permethrin (*cis*-P) (3-phenoxybenzyl(1*RS*)-*cis*-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylate, 99.4 % purity) and *trans*-permethrin (*trans*-P) (3-phenoxybenzyl (1*RS*)-*trans*-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate, 99 % purity) was obtained respectively from ChemService (West Chester, USA) and Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). The internal standards *cis*-[¹³C₆]permethrin (98% purity) and *trans*-[¹³C₂]DCCA (98% purity) were purchased from LGC standard (Cambridge Isotope Laboratories, USA). Corn oil was acquired from Sygma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France).

Animals

Adult male Sprague-Dawley rats were purchased from Janvier (Genet de lisle, France). They weighed 468 g ± 21 g (mean body weight (BW) ± standard deviation (SD)) and were 90-100 days old at the time of the experiments. The experimental protocol was approved by an internal ethic committee. Each rat was housed in a cage with a 12 h light/12 h dark cycle at ambient temperature (22°C ± 2°C) and relative humidity (55 ± 15 %). Food and tap water were provided *ad libitum*. The rats were allowed to a minimum acclimation period of 4 days before experiments.

Experiments

Rats were dosed *per os* with 25 mg/kg of either *cis*- or *trans*-permethrin dissolved in corn oil (2 mL/kg). Access to food was provided 3 h after dosing. Groups of 4 rats were sacrificed with CO₂ at 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 10, 24, 48 h and 6 days after administration. All rats were housed individually in a metabolism cage until euthanasia with a time of residence always below 24 h.

Blood samples were drawn from the inferior vena cava and collected in heparinized tubes. Formic acid 1 % was added V/V to blood to inhibit the metabolism of *cis*- and *trans*-permethrin due to carboxylesterases (CE) enzymes and to preserve the stability of the compounds. The median liver lobe, the perirenal fat, the muscle of the right thigh, the right kidney, the right testis and the brain were isolated and weighted. Urine and feces were collected every day with a metabolism cage until the 6th day. All matrices were frozen at -80 °C until analysis.

Analysis

The extraction and detection of analytes in organs and feces were performed by GC-MS/MS based on the analytical method developed by Lestremau *et al.* (2014). Parent compounds *cis*- and *trans*-permethrin were dosed in each matrix and the metabolites *cis*- and *trans*-DCCA in blood, liver and feces. Parent compounds and the metabolites DCCA, PBA and 4'-OH-PBA were measured in the urine. Briefly, in 1 g (or mL) of all matrices (except urine) previously grinded, target analytes and their internal standards *cis*-[¹³C₆]permethrin and *trans*-[¹³C₂]DCCA were derivatized using a methanolic/hydrochloric acid solution and then extracted by toluene. The extraction of permethrin in fat was performed with an acetonitrile/dichloromethane solution containing a purification step with a blend of Strata X-AW and Na₂SO₄. A column ZB-5MS (30 m × 0.25 mm I.D., 1 μm) and a Varian gas chromatograph 3800 coupled with a Varian ion trap mass spectrometer 4000 were used.

II. DEVELOPPEMENT D'UN MODELE PBPK DE LA PERMETHRINE ET DE SES METABOLITES CHEZ LE RAT

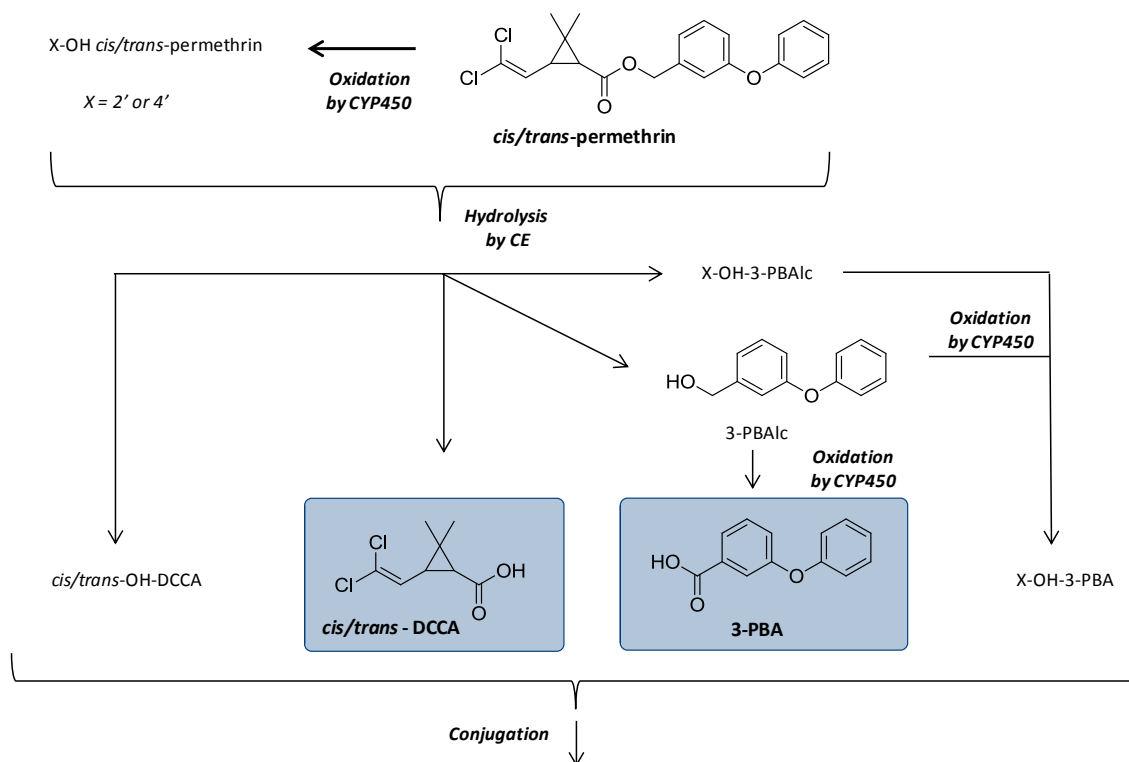


Figure 34. Metabolism of *cis/trans*-permethrin in rats. Permethrin is hydrolyzed mainly in blood and liver with a possible oxidation before (Gaughan *et al.*, 1977). *Cis/trans*-DCCA and 3-PBA (framed compounds) are metabolites related to permethrin commonly dosed in biomonitoring studies. Derived from Choi *et al.* (2002), Hirose *et al.* (2011), Nakamura *et al.* (2007), Ross *et al.* (2006) and Scollon *et al.* (2009).

The limits of quantification for *cis*- and *trans*-permethrin were at 50 µg/L and for *cis*- and *trans*-DCCA at 25 µg/L.

Both parents and metabolites were monitored in urine by LC-MS/MS (Le Grand *et al.* 2012). A column Atlantis T3 (150 mm × 2.1mm I.D., 5 µm) was required with Shimadzu LC-10 AD pumps coupled with a mass spectrometric AB Sciex API-5000. The limit of quantification (LOQ) for *cis*- and *trans*-DCCA, 3-PBA and 4'-OH-PBA was respectively 8 µg/L, 12 µg/L, 10 µg/L and 500 µg/L.

Model Structure

A full PBPK model for *cis*- or *trans*-permethrin was linked in the liver to a simplified PBPK model for the specific metabolite *cis*- or *trans*-DCCA and to empirical models for 3-PBA and 4'-OH-PBA. The relations between each model are represented in Figure 33. A detailed description of the model equations is provided in the annex.

The structure of the PBPK model for *cis*- and *trans*-permethrin is based on existing PBPK models developed for two Type II pyrethroids deltamethrin and permethrin as a mixture of the two isomers *cis* and *trans* (Mirfazaelian *et al.*, 2006; Godin *et al.*, 2010) (Tornero-Velez *et al.*, 2012). Compartments included are usually blood and liver where metabolism occurs, intestines as the route of entry of the compound, fat in which permethrin is accumulated, brain as the target tissue for neurotoxicity, and rapidly and poorly perfused tissues. We extended the permethrin model to include additional compartments for the tissues that were dosed in this study, i.e. testes (a potential target tissue), muscles in which permethrin is suspected to be distributed at high levels (Tornero-Velez *et al.*, 2012) and kidneys a very rapidly perfused tissue. As described in the previous models, the distribution of pyrethroids as deltamethrin and permethrin is not instantaneous in several tissues. Therefore the intestines, kidney, liver and the rapidly perfused tissues were described as flow-limited compartment, and the other compartments (brain, fat, muscle, testes and poorly perfused tissues) as diffusion limited compartments. The oral process was modelled as described by Godin *et al.* (2010) for deltamethrin. The oral absorption was composed of two compartments (stomach and gastro-intestinal (GI) tract) with a single constant of absorption K_i located in the GI tract. The elimination of permethrin is modelled by metabolism in three compartments (GI tract, blood and liver) and by excretion in faeces (no permethrin was detected in urine). The PBPK model of *cis*- or *trans*-permethrin contains then 9 compartments and is identical for both isomers.

The PBPK model for permethrin was linked to models describing the kinetics of the metabolites. In rats, permethrin and its oxidized forms are metabolized by CEs in blood, liver and in a less extent in small intestine. Permethrin is hydrolyzed into the specific metabolite *cis*- and *trans*-DCCA and the (un)oxidized form of 3-phenoxybenzoic alcohol (3-PBA_{lc}) (Ross *et al.*, 2006; Crow *et al.*, 2007). This (un)oxidized carboxylic acid part, common to several pyrethroids, is then oxidized into the forms 4'-OH-phenoxybenzoic acid (4'-OH-PBA) (Gaughan *et al.*, 1977; Takaku *et al.*, 2011) or 3-phenoxybenzoic acid (3-PBA_{acid}), commonly labeled as 3-PBA, in the liver by cytochromes P450 (CYP) (Nakamura *et al.*, 2007; Mikata *et al.*, 2012). Figure 34 summarized the main metabolic pathways in rats of permethrin and the involved enzymes.

Tableau 23. Physiological parameters for PBPK models of *cis*- and *trans*-permethrin and metabolites *cis*- and *trans*-DCCA in rats

Parameters	Value	Source
Body Weight (BW) (kg)	0.47	Exp data
Total cardiac flow (Q_c, L/h/kg^{0.75})	14.1	Brown <i>et al.</i> (1997)
Relative tissue volumes (% of BW)		
Blood (V_{blo})	7.4	Brown <i>et al.</i> (1997)
Brain (V_{bra})	0.4	Exp data
Fat (V_{fat})	7.0	Brown <i>et al.</i> (1997)
Kidney (V_{kid})	0.6	Exp data
GI tract (V_{gi})	2.7	Brown <i>et al.</i> (1997)
Liver (V_{liv})	3.5	Exp data
Muscle (V_{mus})	40.4	Brown <i>et al.</i> (1997)
Testes (V_{tes})	0.8	Exp data
Non perfused	5	Brown <i>et al.</i> (1997)
Rapidly perfused (V_{rp})	4.6	Brown <i>et al.</i> (1997)
Slowly perfused (V_{sp})	27.6	1 - all organs - non perfused
Rest of body * (V_{rb})	89.1	1 - blood - liver - non perfused
Tissue blood flow (% cardiac output)		
Brain (Q_{bra})	2.0	Brown <i>et al.</i> (1997)
Fat (Q_{fat})	7.0	Brown <i>et al.</i> (1997)
Kidney (Q_{kid})	14.1	Brown <i>et al.</i> (1997)
Liver (total) ($Q_{liv out}$)	17.5	Brown <i>et al.</i> (1997)
Portal (GI tract) (Q_{gi})	15.1	
Arterial ($Q_{iv a}$)	2.4	
Muscle (Q_{mus})	27.8	Brown <i>et al.</i> (1997)
Testes (Q_{tes})	0.4	Waites (1991)
Rapidly perfused (Q_{rp})	24.9	1 - all organ flows
Slowly perfused (Q_{sp})	6.3	Brown <i>et al.</i> (1997)
Rest of body * (Q_{rb})	82.6	1 - total liver flow
Blood volume fraction (% of tissue)		
Brain (BV_{bra})	3	Brown <i>et al.</i> (1997)
Fat (BV_{fat})	2	Tornero-Velez <i>et al.</i> (2012)
Slowly perfused (BV_{sp})	4	Assimilated to muscle Tornero-Velez <i>et al.</i> (2012)
Testes (BV_{tes})	4	Assimilated to muscle Tornero-Velez <i>et al.</i> (2012)
Rest of body * (BV_{rb})	5	

*: only for the PBPK model of the metabolite DCCA.

Note: GI tract tissue volume contains stomach, small and large intestines. Volume of the rapidly perfused tissues stands for heart, lung, adrenal, trabecular bone, marrow, pancreas, spleen and thyroid. Volume of the non perfused tissues stands for the GI tract content. Flow of slowly perfused tissues stands for cortical bones and skin. Rest of body corresponds to all the organs except liver.

To our best knowledge, the kinetics of permethrin metabolites have not been yet modeled in rats. An empirical compartmental model was proposed by Tornero-Velez *et al.* (2012) for DCCA in humans. Because the concentrations of DCCA were measured in several matrices (blood, liver, urine and feces) we chose a physiological description for the DCCA kinetics. A reduced PBPK model was proposed containing three compartments: blood, liver and the rest of the body. That latter was defined as a diffusion limited compartment. The urinary excretion was modeled in blood and the excretion in feces in liver. Both reactions were described by first order rates (respectively K_{uri_DCCA} and K_{fec_DCCA}). A 2-compartment model of 3-PBA and 4'-OH-PBA was developed to describe their urinary elimination. Metabolites were eliminated from blood to urine with a first order rate constant (K_{uri_X}). For all metabolites, we assumed that their appearance takes place only in liver since metabolism occurs predominantly in that organ (Crow *et al.*, 2007). However the formation of each metabolite was dependent of the whole metabolite production in the three metabolism sites and was expressed as a fraction ($Frac_{met_X}$) of the total clearance of *cis*- or *trans*-permethrin:

$$\frac{dA_{Met_X}}{dt} = Frac_{Met_X} \times (R_{liv_PER} + R_{GI_PER} + R_{blo_PER}) \times \frac{MW_X}{MW_{PER}} \quad (1)$$

where R_{liv_PER} , R_{GI_PER} , R_{blo_PER} are respectively the metabolic rates of permethrin in liver, GI tract and blood. Because the amounts were expressed in mg, the amount of metabolites produced was multiplied by the ratio of the molecular weights (MW).

Model parameterization

The physiological parameters are summarized in Table 23 and were measured in the rats used in this study (volumes) or obtained from the literature (Waites, 1991; Brown *et al.*, 1997; Schoeffner, 1999). The specific permethrin parameters were all estimated except the blood and intestinal metabolic rates. These latter were fixed respectively to 0.08 L/h/kg and 0.04 L/h for *cis*-permethrin and to 0.31 L/h/kg and 0.4 L/h for *trans*-permethrin (Tornero-Velez *et al.*, 2012). These rates are based on the extrapolation of *in vitro* experiments on whole serum of rat (Crow *et al.*, 2007) and rat intestinal tissues (Nakamura *et al.*, 2007).

The other parameters specific to permethrin and metabolites were estimated in a Bayesian framework. In such analysis, each parameter is considered as a random variable. A probability prior probability distribution was assigned to each parameter and should reflect the prior knowledge on the parameter's values. The Bayes theorem was used to update the prior distribution using the available data collected in the toxicokinetic study in order to derive a posterior distribution that can then be viewed as a combination of the prior knowledge and the information contained in the data (Gelman *et al.*, 1996; Davis *et al.*, 2012). If the data contained information about the parameters, the posterior distribution is usually tighter than the prior distribution.

The prior distributions assigned to the parameters to be estimated are presented in Table 24. All parameters were assumed to follow a truncated normal distribution since some values of estimated parameters were previously known (Gaughan *et al.* 1977; Scollon *et al.* 2009; Tornero-Velez *et al.* 2012). For parameters related to permethrin, the same prior distribution with a large range was attributed to the partition and permeability coefficients of brain, kidney, testes and liver since we assumed that kinetic of permethrin in these organs is similar.

II. DEVELOPPEMENT D'UN MODELE PBPK DE LA PERMETHRINE ET DE SES METABOLITES CHEZ LE RAT

Tableau 24. Distribution of *cis*- and *trans*-permethrin specific parameters of the PBPK model in rats. All prior distributions of parameters are a truncated normal distribution represented by the average value +/- SD and their boundaries. Posterior distributions are represented by the mean with the 2.5th and 97.5th percentiles.

Parameters	Prior distribution		Posterior distribution	
	<i>Cis</i> -Permethrin	<i>Trans</i> -Permethrin	<i>Cis</i> -Permethrin	<i>Trans</i> -Permethrin
Partition coefficients				
Brain:blood (PC_{bra})	0.4 ± 0.2 [10 ⁻³ - 30]	0.4 ± 0.2 [10 ⁻³ - 30]	1.6 [1.4 - 1.8]	0.57 [0.47 - 0.66]
Fat:blood (PC_{fat})	150 ± 75 [5 - 500]	50 ± 25 [5 - 500]	226 [156 - 302]	77 [67 - 84]
GI:blood (PC_{gi})	Equal to PC_{kid}	Equal to PC_{kid}	-	-
Kidney:blood (PC_{kid})	0.4 ± 0.2 [10 ⁻³ - 30]	0.4 ± 0.2 [10 ⁻³ - 30]	1.1 [1.0 - 1.2]	0.21 [0.15 - 0.27]
Liver:blood (PC_{liv})	0.4 ± 0.2 [10 ⁻³ - 30]	Equal to PC_{kid}	0.89 [0.77 - 0.98]	-
Muscle:blood (PC_{mus})	6 ± 3 [10 ⁻³ - 30]	6 ± 3 [10 ⁻³ - 30]	1.2 [1.0 - 1.4]	0.82 [0.67 - 0.95]
Testes:blood (PC_{tes})	0.4 ± 0.2 [10 ⁻³ - 30]	Equal to PC_{bra}	0.63 [0.52 - 0.72]	-
Rapidly perfused:blood (PC_{rp})	Equal to PC_{kid}	Equal to PC_{kid}	-	-
Slowly perfused:blood (PC_{sp})	6 ± 3 [10 ⁻³ - 30]	6 ± 3 [10 ⁻³ - 30]	19 [14 - 23]	8.4 [1.06 - 14]
Permeability coefficients (L/h)				
Brain (PA_{bra})	10 ⁻³ ± 10 ⁻³ [10 ⁻⁵ - 1]	10 ⁻³ ± 10 ⁻³ [10 ⁻⁵ - 1]	1.0.10⁻³ [7.8.10 ⁻⁴ - 1.2.10 ⁻³]	1.1.10⁻³ [0.8.10 ⁻³ - 1.6.10 ⁻³]
Fat (PA_{fat})	0.1 ± 0.1 [10 ⁻⁵ - 1]	0.1 ± 0.1 [10 ⁻⁵ - 1]	4.8.10⁻² [4.2.10 ⁻² - 5.4.10 ⁻²]	0.11 [0.09 - 0.12]
Muscles (PA_{mus})	0.1 ± 0.1 [10 ⁻⁵ - 1]	0.1 ± 0.1 [10 ⁻⁵ - 1]	0.33 [0.20 - 0.47]	0.48 [0.35 - 0.60]
Testes (PA_{tes})	10 ⁻³ ± 10 ⁻³ [10 ⁻⁵ - 1]	Equal to $PA_{bra}/3$	3.3.10⁻⁴ [2.5.10 ⁻⁴ - 4.0.10 ⁻⁴]	-
Slowly perfused (PA_{sp})	0.1 ± 0.1 [10 ⁻⁵ - 1]	0.1 ± 0.1 [10 ⁻⁵ - 1]	0.31 [0.20 - 0.41]	0.062 [2.4.10 ⁻³ - 0.19]
Rate constants (h⁻¹)				
Stomach-intestine transfer (K_{si})	0.5 ± 0.25 [0 - 2]	0.5 ± 0.25 [0 - 2]	0.34 [0.29 - 0.40]	0.20 [0.17 - 0.23]
Intestinal absorption (K_{int})	0.5 ± 0.25 [0 - 2]	0.5 ± 0.25 [0 - 2]	0.52 [0.39 - 0.62]	1.3 [1.1 - 1.6]
Fecal excretion (K_{fec})	0.5 ± 0.25 [0 - 2]	0.5 ± 0.25 [0 - 2]	0.40 [0.31 - 0.49]	0.85 [0.64 - 1.03]
Metabolic clearances				
GI metabolism (L/h) (K_{gi})	Fixed to 0.04	Fixed to 0.4	-	-
Blood metabolism (L/h/kg) (K_{blo})	Fixed to 0.08	Fixed to 0.31	-	-
Liver metabolism (L/h/kg) (K_{liv})	3 ± 3 [10 ⁻⁵ - 20]	10 ± 10 [10 ⁻⁵ - 40]	2.3 [1.8 - 2.6]	4.3 [3.4 - 4.8]

Parameters related to fat, muscle and slowly perfused tissues have their own prior distribution with higher values to take account of the accumulation of permethrin in these organs. A large range was used for prior distribution of absorption constants, with a mean value corresponding to average of values obtained by Tornero-Velez *et al.* (2012). The mean of metabolic clearances were informed by the published values of 3.47 L/h/kg BW and 9.86 L/h/kg BW for respectively *cis*- and *trans*-permethrin (Tornero-Velez *et al.*, 2012). These values result of an optimization of *in vivo* clearances obtained by the extrapolation of *in vitro* results on human microsomes (Scollon *et al.*, 2009). Simplifications for permethrin parameters were made when no prior information were available. Partition coefficient of GI tract (PC_{gi}) and PC of rapidly perfused tissues (PC_{rp}) of both isomers of permethrin were assimilated to PC of kidney (PC_{kid}). Only for *trans*-permethrin PC of liver (PC_{liv}) was assumed to be equal to PC_{kid} and PC of testes (PC_{tes}) to PC of brain (PC_{bra}) since no compounds were detected in these organs. The permeability coefficient of testes (PA_{tes}) was assumed to be three times lower than one of brain (PA_{bra}) based on the ratio of the permeability coefficients estimated for *cis*-permethrin in these organs.

A same uniform distribution was assigned to the fractions of metabolite formed since less data were available in the literature. The mean value for urine excretion of DCCA was the inverse of 16.5 h, corresponding to the mean half-life of the urinary elimination of the 3 metabolites (DCCA, 3-PBA and 4'-OH-PBA) after an ingestion of cypermethrin (Woollen *et al.*, 1992). The mean value of the truncated distribution of 3-PBA was lower than the other metabolites, consistent with the urinary results. The prior distributions of partition and permeability coefficients and fecal elimination rates of DCCA were assimilated to ones of permethrin since no data were available.

The likelihood on the data was assumed to follow a lognormal distribution with 15% of error. The error on blood concentrations in permethrin was assumed at 5 % to correctly reproduce the kinetic. The calibration of the PBPK model was performed on the average of the concentrations obtained from the group of 4 rats euthanized at the specific time point.

Markov Chain Monte Carlo method was used to estimate the probability posterior distribution, performed with MCSim software (Bois and Mazle, 1997). 3 independent Markov chains of 10,000 iterations were run and one in two of the 5,000 last iterations were recorded. A stable posterior distribution was considered to be reached when the convergence criterion R was below 1.1.

The toxicokinetic parameters the half-life of elimination of the compound ($T_{1/2}$) and the area under the curve (AUC) of concentrations vs time were computed in the different organs on estimated concentrations, and also on observed concentrations for the AUC.

Verification of the rat PBPK model of permethrin

The verification of the PBPK model consisted in testing the ability of the calibrated PBPK model to predict the toxicokinetics of permethrin obtained under experimental conditions. One dataset was available for this verification step. We used the study of Tornero-Velez *et al.* (2012) in which *in vivo* experiments in rats were performed for a mixture (40:60) of *cis*- and *trans*-permethrin at two oral doses, 1 mg/kg and 10 mg/kg of permethrin. The concentrations of isomers were predicted in four fluids or organs (blood, liver, fat and brain) at doses 0.4 and 4 mg/kg for *cis*-permethrin and 0.6 and 6 mg/kg for *trans*-permethrin.

II. DEVELOPPEMENT D'UN MODELE PBPK DE LA PERMETHRINE ET DE SES METABOLITES CHEZ LE RAT

Tableau 25. Distribution of specific parameters of *cis*- and *trans*-DCCA, 3-PBA and 4'-OH-PBA for PBPK model in rats. The prior distributions of all parameters are a truncated normal one represented by the average value +/- SD and their boundaries, except the rate of formation of metabolites represented by a uniform distribution. Posterior distributions are represented by the mean with the 2.5th and 97.5th percentiles.

Parameters	Metabolites of <i>cis</i> -permethrin					
	Prior distribution			Posterior distribution		
	<i>Cis</i> -DCCA	3-PBA	4'-OH-PBA	<i>Cis</i> -DCCA	3-PBA	4'-OH-PBA
Partition coefficients						
Liver:blood (PC_{liv})	10 ± 5 [1 - 30]	-	-	6.3 [5.0 - 7.6]	-	-
Rest of body:blood (PC_{rb})	10 ± 5 [1 - 30]	-	-	3.4 [2.5 - 4.2]	-	-
Permeability coefficients (L/h)						
Rest of body:blood (PA_{rb})	0.1 ± 0.1 [10 ⁻⁵ - 2]	-	-	0.84 [0.68 - 0.98]	-	-
Fraction of metabolite formed						
Fraction ($Frac_{met}$)	[10 ⁻⁵ - 1]	[10 ⁻⁵ - 1]	[10 ⁻⁵ - 1]	0.22 [0.19 - 0.26]	5.4.10⁻³ [4.5.10 ⁻³ - 6.4.10 ⁻³]	0.29 [0.23 - 0.34]
Rate constants						
Fecal excretion (L/h) (K_{fec})	0.5 ± 0.25 [0 - 2]	-	-	1.0 [0.8 - 1.2]	-	-
Urine excretion (h ⁻¹) (K_{uri})	0.05 ± 0.025 [0 - 0.2]	0.05 ± 0.025 [0 - 0.2]	0.05 ± 0.025 [0 - 0.2]	0.038 [0.029 - 0.046]	0.075 [0.041 - 0.111]	0.070 [0.038 - 0.105]

Parameters	Metabolites of <i>trans</i> -permethrin					
	Prior distribution			Posterior distribution		
	<i>Trans</i> -DCCA	3-PBA	4'-OH-PBA	<i>Trans</i> -DCCA	3-PBA	4'-OH-PBA
Partition coefficients						
Liver:blood (PC_{liv})	10 ± 5 [1 - 30]	-	-	4.4 [3.8 - 5.1]	-	-
Rest of body:blood (PC_{rb})	10 ± 5 [1 - 30]	-	-	2.7 [2.0 - 3.3]	-	-
Permeability coefficients (L/h)						
Rest of body:blood (PA_{rb})	0.1 ± 0.1 [10 ⁻⁵ - 1]	-	-	0.24 [0.16 - 0.34]	-	-
Fraction of metabolite formed						
Fraction ($Frac_{met}$)	[10 ⁻⁵ - 1]	[10 ⁻⁵ - 1]	[10 ⁻⁵ - 1]	0.52 [0.44 - 0.59]	0.048 [0.040 - 0.055]	0.46 [0.38 - 0.53]
Rate constants						
Fecal excretion (L/h) (K_{fec})	0.5 ± 0.25 [0 - 2]	-	-	0.42 [0.33 - 0.48]	-	-
Urine excretion (h ⁻¹) (K_{uri})	0.05 ± 0.025 [0 - 0.2]	0.05 ± 0.025 [0 - 0.2]	0.05 ± 0.025 [0 - 0.2]	0.017 [0.014 - 0.020]	0.078 [0.043 - 0.113]	0.070 [0.037 - 0.104]

Because we observed some differences for the absorption phase of permethrin in rats, we tested two hypotheses with our model: 1) the PBPK model calibrated in this study was used, 2) the absorption parameters (K_{si} and K_{int}) were set to the estimates obtained in Tornero-Velez *et al.* (2012) and all the other parameters were set to the estimates obtained here. The predictions obtained by the PBPK model developed by Tornero-Velez *et al.* (2012) was also evaluated. The root mean-square error (RMSE) score was computed to quantify the quality of the predictions obtained with the different conditions of simulations:

$$\text{RMSE score} = \sqrt{\frac{\sum(\text{predicted concentration} - \text{observed concentration})^2}{\text{number of observations}}} \quad (2)$$

The model predictions associated to the lowest RMSE score indicates the model that best fits to the data.

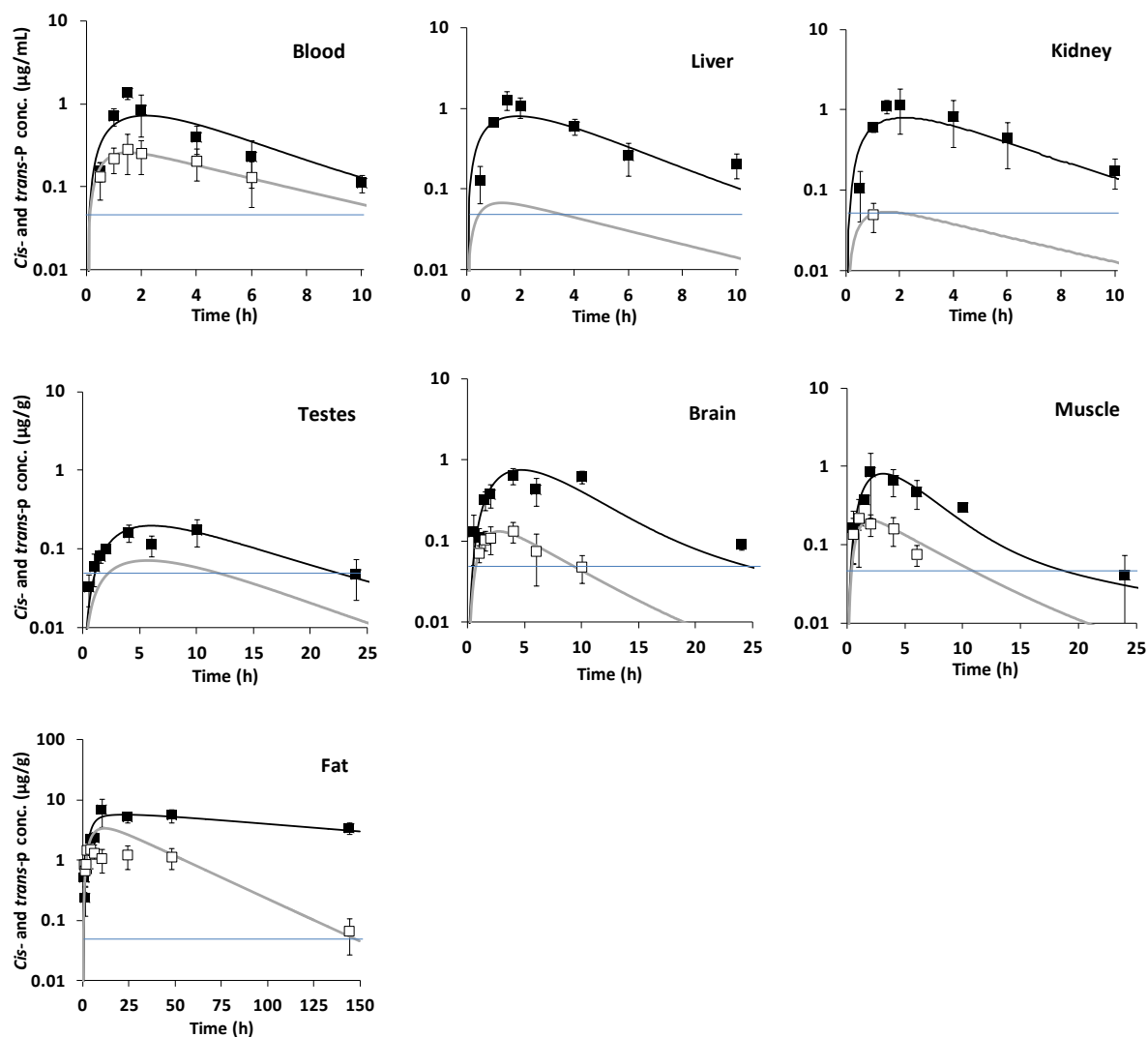


Figure 35. Kinetic of observed concentrations of *cis*-permethrin (closed square) and *trans*-permethrin (open square) and estimated concentrations of *cis*-permethrin (black solid line) and *trans*-permethrin (grey solid line) in blood, liver, kidney, brain, testes, muscle and fat. The blue solid line stands for the LOQ of permethrin.

Tableau 26. Pharmacokinetic parameter the half-life of residence ($T_{1/2}$) of *cis*- and *trans*-permethrin and its metabolites *cis*- and *trans*-DCCA in blood, brain, fat, kidney, liver, muscle and testes determined on estimated concentrations

	<i>Cis</i> -Permethrin	<i>Trans</i> -Permethrin	<i>Cis</i> -DCCA	<i>Trans</i> -DCCA
Blood	3.2	3.8	19.8	40.8
Brain	4.4	4.0	-	-
Fat	139	23.3	-	-
Kidney	3.2	-	-	-
Liver	2.6	-	8.7	43.3 *
Muscle	3.2	3.9	-	-
Testes	7.7	-	-	-

*: correspond to the half life of the second part of elimination

Results

Pharmacokinetic profiles of *cis*- and *trans*-permethrin

Figure 35 and Table 24, 26 and 27 represent the kinetics of *cis*- and *trans*-permethrin in all studied organs and the values of parameters estimated with our PBPK model. *Cis*- and *trans*-permethrin compounds were both detected in blood, feces and all tissues (liver, muscle, kidney, testes, brain, fat) at all data points. However concentration in *trans*-permethrin was below the LOQ in liver, kidney and testes. Permethrin was detected 30 min after the administration in all matrices, except feces. Both *cis* and *trans* isomers are rapidly absorbed on the intestine, with respectively estimated values of K_{int} at 0.52 h^{-1} and 1.3 h^{-1} . In blood, *cis*-permethrin is the most persistent isomer with a 2.7-ratio between the AUC of estimated concentrations (AUC_{est}) of *cis*-permethrin on one of *trans*-permethrin. *Trans*-permethrin is rapidly eliminated in liver with an *in vivo* hepatic clearance estimated at 4.3 L/h/kg whereas *cis*-permethrin stays longer with a clearance estimated 1.9 times slower, at 2.3 L/h/kg . This *in vivo* ratio between the estimated values of hepatic clearances of *cis* and *trans* isomers is similar to the 3-factor obtained between the hepatic clearances of isomers estimated on *in vitro* supports with rat microsomes or obtained on *in vivo* optimized values (Scollon *et al.*, 2009; Tornero-Velez *et al.*, 2012).

The diffusion profiles of *cis* and *trans* isomers in most of the organs are similar to the one in blood with a value of T_{max} at respectively 2 h and 1.5 h. A slower diffusion of permethrin occurs in organs having a physiological barrier like brain and testes or a lipophilic composition such as fat. Estimated values of T_{max} from 5 h (brain) to 20.5 h (fat) are higher and values of permeability coefficients are low estimated between $3.3 \cdot 10^{-4} \text{ L/h}$ (testes) to $4.8 \cdot 10^{-2} \text{ L/h}$ (fat) in the case of *cis*-permethrin. Both *cis* and *trans* isomers accumulate in fat with a respective value of PC_{fat} at 226 and 77 and a high value of $T_{1/2}$ at 139 h^{-1} and 23 h^{-1} . This result is characteristic of the kinetic of pyrethroids in lipophilic tissues. In all studied organs *cis*-permethrin has a longer residence time than *trans*-permethrin, from a 4- to a 8-factor respectively in muscle and fat between the value of AUC_{est} of *cis*- and *trans*-isomers. In target organs, *cis*-permethrin is more persistent in brain than in testes with a value of PC_{bra} 2.6 times higher than one of PC_{tes} . No parent compounds were detected in urine which is consistent with previous observations of Leng *et al.* (2005). Complete excretion of *cis*- and *trans*-permethrin into feces 24 h after the administration, with a total recovery of respectively 20 % and 18 % of the dose after 6 days, were consistent with the oral bioavailability of 61 % of *cis*- and *trans*-permethrin announced by Anadon *et al.* (1991).

Pharmacokinetic profiles of metabolites *cis*-DCCA, *trans*-DCCA, 3-PBA and 4'-OH-PBA

The kinetic of metabolites of permethrin and the values of the parameters were estimated simultaneously to the ones of permethrin and are presented in Figure 36 and 37 and Table 25. The specific metabolite DCCA is rapidly formed in blood and liver since it is quantified 30 min after the administration of permethrin. The maximal concentration of DCCA is reached with a delay from 1 to 2 h to the ones of parent compounds. *Cis*- and *trans*-permethrin are mainly transformed in the metabolites DCCA and 4'-OH-PBA, with an estimated fraction at respectively 0.22 and 0.29 following the exposure to *cis*-permethrin, and at 0.52 and 0.46 after an exposure to *trans*-permethrin. With an estimated fraction from 10 to 40 times lower, 3-PBA is produced in a lesser extent.

Tableau 27. Average and standard deviation of values of the pharmacokinetic parameters the area under the curve of the observed concentrations (AUC_{obs}) and the estimated concentrations (AUC_{est}) ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$) of *cis*- and *trans*-permethrin and *cis*- and *trans*-DCCA vs times in blood, brain, fat, kidney, liver, muscle and testes

	<i>Cis</i> -permethrin		<i>Trans</i> -permethrin		<i>Cis</i> -DCCA		<i>Trans</i> -DCCA	
	AUC_{obs}	AUC_{est}	AUC_{obs}	AUC_{est}	AUC_{obs}	AUC_{est}	AUC_{obs}	AUC_{est}
Blood	4.5	5.4 ± 0.1	1.8*	2.0 ± 0.1	1.7	5.3 ± 0.6	37.5	41.3 ± 2.7
Brain	10.2	8.7 ± 0.5	1.1*	1.2 ± 0.8	-	-	-	-
Fat	1366*	1170 ± 151	117	148 ± 7	-	-	-	-
Kidney	6.4	6.0 ± 0.3	-	0.41 ± 0.06	-	-	-	-
Liver	5.9*	5.0 ± 0.2	-	0.45 ± 0.07	45.1	35.1 ± 2.2	245.8	184 ± 10
Muscle	7.5	6.7 ± 0.5	0.9*	1.6 ± 0.1	-	-	-	-
Testes	3.3	3.5 ± 0.2	-	1.2 ± 0.8	-	-	-	-

Note. AUC_{obs} was defined as the sum of the AUC computed with the trapezoidal rule on experimental concentrations and the AUC_{est} , defined as the last observed concentration divided by the slope of elimination. *: value of extrapolated AUC was over 20 % but not exceeded 50 % of the total AUC.

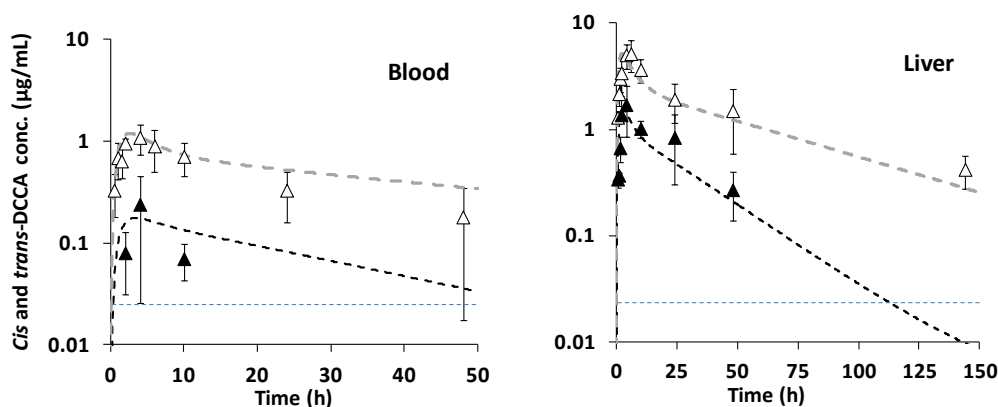


Figure 36. Kinetic of observed concentrations of *cis*-DCCA (▲) and *trans*-DCCA (Δ) and estimated concentrations of *cis*-DCCA (— —) and *trans*-DCCA (— —) in blood and liver. The blue dotted line (— · —) stands for the LOQ of DCCA.

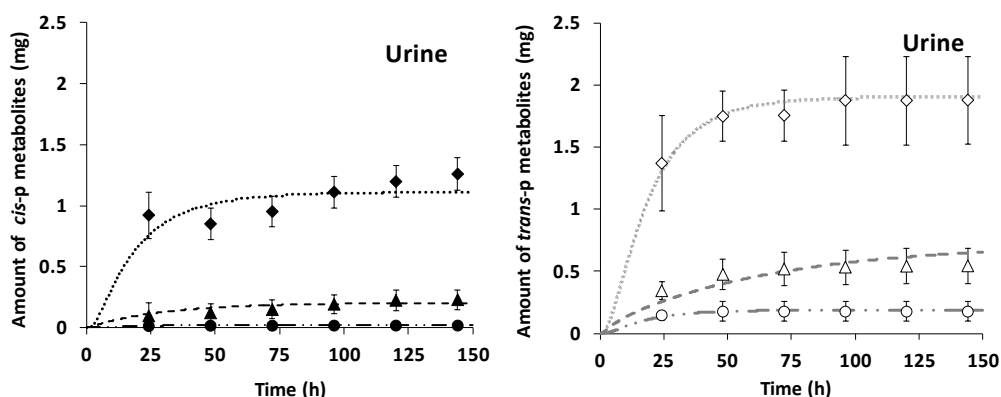


Figure 37. Kinetics of observed concentrations of metabolites 4'-OH-PBA (◊), DCCA (Δ) and 3-PBA (○) and estimated concentrations of 4'-OH-PBA (· ·), DCCA (— —) and 3-PBA (— · —) in urine. Closed symbols and black lines are related to *cis*-permethrin and open symbols and grey lines to *trans*-permethrin.

By applying these factors to the total clearances of permethrin, the rates of formation of DCCA, 4'-OH-PBA and 3-PBA in the body rat are estimated respectively at 0.53, 0.70 and 0.013 L/h/kg after an exposure to *cis*-permethrin and at 2.60, 2.30 and 0.24 L/h/kg after an exposure to *trans*-permethrin. Due to the higher clearance of *trans*-permethrin, *trans*-DCCA is recovered in higher amount in blood and liver than *cis*-DCCA, with an AUC_{est} ratio *trans:cis* DCCA from 5 in liver to 8 in blood (Table 27). Formed mainly in liver, *cis*- and *trans*-DCCA both accumulate in this organ since the estimated values of partition coefficients of *cis*-DCCA and *trans*-DCCA were high at respectively 6.3 and 4.4. The elimination of DCCA from the liver is slow with a value of half life at 8.7 h^{-1} for *cis*-DCCA. Contrary to the *cis* isomer, *trans*-DCCA presents a kinetic of elimination from liver in two phases with a value of half-life at 43.3 h^{-1} for the second phase.

The complete excretion of studied metabolites occurs in the first 24 hours in urine and 48 hours in feces. For both isomers, 4'-OH-PBA is the most recovered metabolites in urine, with a 5- and a 10-factor compared respectively to *cis*-DCCA and 3-PBA in the case of *cis*-permethrin. DCCA is mainly excreted into feces. 74 % for *cis*-DCCA and 36 % for *trans*-DCCA of the total amount in DCCA eliminated are recovered in feces. In feces PBA was not detected and 4'-OH-PBA not dosed.

Quality of the calibration of the rat PBPK model for each isomer of permethrin and its metabolites

With the calibration of the rat PBPK model, values of 49 parameters related to the kinetic of *cis*- and *trans*-permethrin and its metabolites *cis*- and *trans*-DCCA, 4'-OH-PBA and 3-PBA were estimated simultaneously. The highest R computed for both isomers was at 1.05 attesting of the convergence of all chains. Posterior distributions and the 2.5th and 97.5th percentiles values of parameters of parent and metabolites compounds are respectively detailed in Table 24 and Table 25. Thanks to the information brought by the data, posterior distributions of parameters, previously assumed to follow a truncated normal distribution with a wide range, became narrow with all coefficients of variation related to parameters under 20 %. These coefficients are obviously higher for values of parameters related to non informed tissues like slowly perfused. The estimated concentrations in permethrin are in a good agreement with the observed concentrations for all the organs, with a range from 0.94-factor in kidney for *cis*-permethrin to 1.26-factor in fat for *trans*-permethrin between the AUC of the observed and the estimated concentrations (Table 27). The concentrations in *trans*-permethrin are overestimated in fat. The estimated value of *in vivo* hepatic clearance seems to induce an excess of amount in *trans*-permethrin in the circulating flow which accentuated the accumulation of the *trans* isomer in fat. A difference at 55 % between the values of AUC_{obs} and AUC_{est} in *trans*-permethrin in muscle is observed probably due to the small number of observed data points in the elimination process of the compound.

After the calibration of the model, distribution of parameters related to DCCA, 3-PBA and 4'-OH-PBA became also narrow, attesting that measured data on metabolites are informative for the estimation of the value of these parameters. Thus, estimated values of parameters associated to DCCA allow predicting satisfactory kinetics of this metabolite in blood and liver. The AUC of estimated concentrations of *cis*-DCCA in blood is higher than the AUC_{obs} due to the few number of measured data points in this matrix.

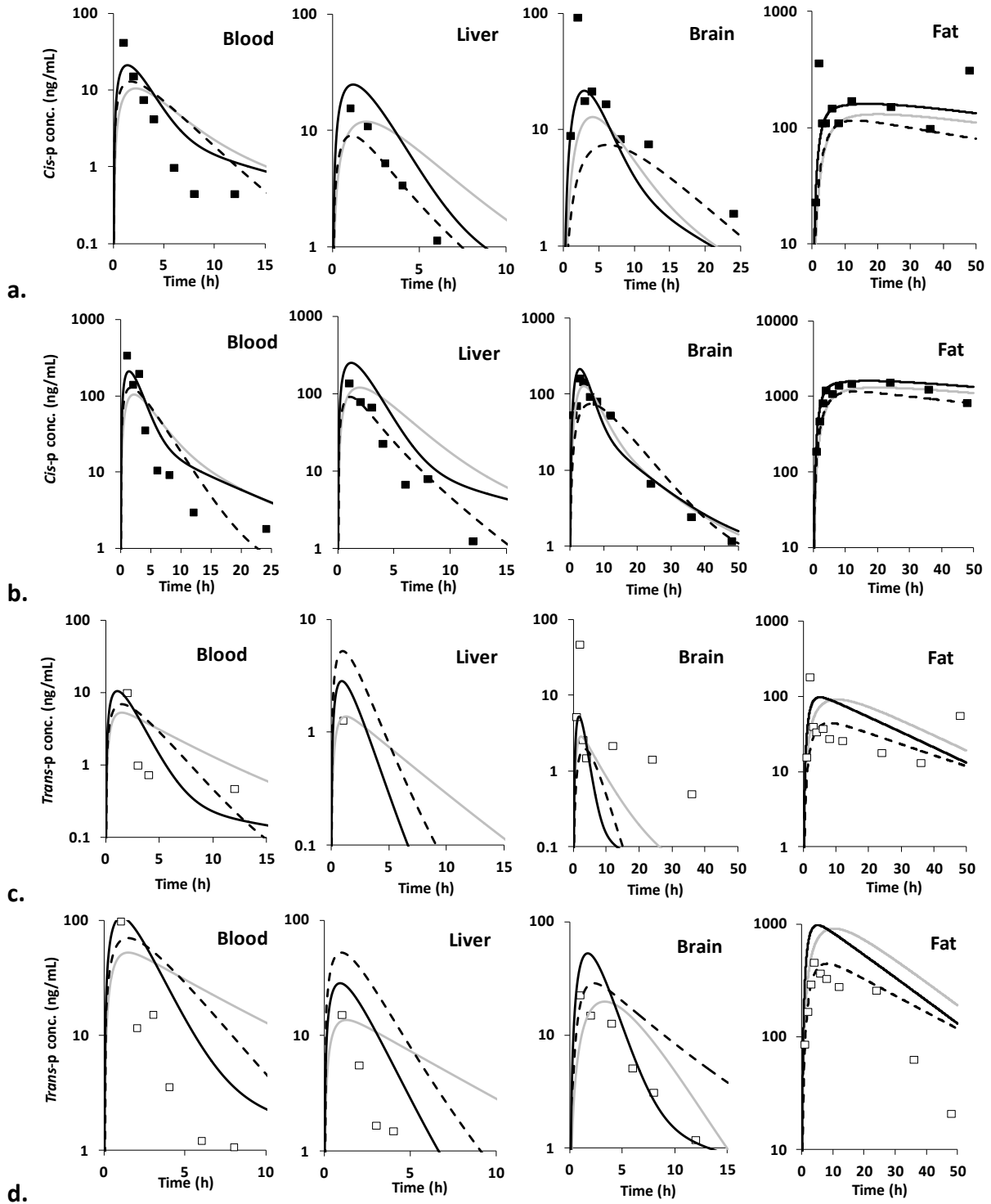


Figure 38. Observed concentrations in blood, liver, brain and fat after an oral dose of 0.4 mg/kg (a) and 4 mg/kg (b) in *cis*-permethrin (■) and 0.6 mg/kg (c) and 6 mg/kg (d) in *trans*-permethrin (□). The results of predicted concentrations with the values of parameter estimated with the rat PBPK model of permethrin of Tornero-Velez et al. (2012) (---), with our PBPK model of permethrin and metabolites (—) and with our PBPK model with absorption rate fixed to values of Tornero-Velez et al. (2012) (—) are also represented.

Verification of the model rat

The calibrated PBPK model was evaluated for the prediction of the concentrations of permethrin in four fluids or tissues after the co-administration of both isomers at 1 and 10 mg/kg. The concentrations estimated by the model (Tornero-Velez *et al.* (2012)) previously published are also discussed. The predictions by the three models are represented together with the data on Figure 38. The toxicokinetic profiles predicted with our calibrated PBPK model were not in a good agreement with observed data as the time of residence of permethrin in organs was over-predicted. This problem was caused mainly by the absorption process of the compound since the predictions of our model were improved by setting the absorption parameters to the values estimated by Tornero-Velez *et al.* (2012), i.e. K_{si} and K_{int} set respectively to 0.7 h^{-1} and 0.9 h^{-1} for both isomers. Variability in the oral absorption can come from different absorption levels of the rats and from the experimenter during the technique of force-feeding of the animal. The results of RMSE scores (Table 28) were computed for predictions of the PBPK model developed by Tornero-Velez *et al.* (2012) using these data and by the predictions of our PBPK model with the absorption parameters set to the previous published estimates. Our model presents the lowest values of score. A better fit of the predicted concentrations to the observed data was observed, especially for concentrations in blood for both isomers and in liver for *trans*-permethrin. However the quality of the prediction of the hepatic concentrations in *cis*-permethrin remains better using the other model. The improvement of the accuracy of the predicted concentrations also occurs in brain for both isomers and in fat with *cis*-permethrin but in a lesser extent. For *trans*-permethrin, even the score is higher in brain at the high dose, the values of parameters allow predicting concentrations reproducing the kinetic profile. Thus our PBPK model can correctly reproduce observed concentrations in these organs with another dataset, except at the highest concentration of exposure in *trans*-permethrin in fat. This accumulation is consistent with the estimated values of PC_{fat} of *trans*-permethrin during the calibration of our model.

Tableau 28. Results of RMSE scores computed on blood, hepatic, brain and fat concentrations obtained by simulations of *cis* and *trans*-permethrin at the dose of the specific isomer at 1 mg/kg and 10 mg/kg with the ratio 40:60. Condition A and B corresponds to values of parameters estimated respectively with the PBPK model of permethrin (Tornero-Velez *et al.* (2012)) and with the PBPK model of permethrin and its metabolites when absorption rates are fixed at ones of Tornero-Velez *et al.* (2012).

Condition	Blood		Liver		Fat		Brain	
	A	B	A	B	A	B	A	B
0.4 mg/kg <i>cis</i> -permethrin	11.8	8.9	2.2	6.7	131	110	30.4	24.6
0.6 mg/kg <i>trans</i> -permethrin	2.53	1.73	3.96	1.54	54.2	57.0	17.1	15.7
4 mg/kg <i>cis</i> - permethrin	79.7	54.9	19.4	73.0	297	237	45.7	47.2
6 mg/kg <i>trans</i> - permethrin	34.9	32.0	21.5	8.11	86.8	431	7.56	17.1

Values in bold correspond to the lowest score between condition A and B

Discussion

As the *in vivo* metabolism of permethrin is rapid, the metabolites DCCA, 3-PBA and 4'-OH-PBA are considered as biomarkers of an exposure to permethrin. The PBPK models are tools able to quantify the internal dose of exposure of the parent compound based on the data in metabolites. Since metabolites are often dosed in biomonitoring studies and permethrin is the toxic form, the developed PBPK model in this study is able to predict simultaneously the concentrations of the parent compound in target tissues and of the metabolites in urine after an external exposure to *cis*- or *trans*-permethrin.

The model structure is based on the model of permethrin developed by Tornero-Velez *et al.* (2012), with the addition of the description of the kinetic of permethrin in target organs. A physiological model for DCCA (2 compartments) and empirical models of the other metabolites 3-PBA and 4'-OH-PBA common to pyrethroids allow the prediction of concentrations in urine. The calibration of the PBPK model of each isomer was performed in a Bayesian framework on *in vivo* results to estimate a distribution of values for the 49 parameters describing ADME process for both parent compounds and metabolites, especially excretion of metabolites to urine (Davis *et al.*, 2012).

Our experiments performed in rats with separately *cis*- and *trans*-permethrin were the first one to quantify simultaneously the complete kinetic of both parent compounds and metabolite. The developed PBPK model with the estimated values of parameters correctly reproduces the observed concentrations for parent compounds and metabolites in all matrices. The model fits were in good agreement with the data, especially in blood and liver where metabolism takes place. The predicted kinetics of both isomers are consistent with the kinetics of permethrin previously published: large accumulation of permethrin in fat with values of PC_{fat} from 77 to 226 times higher to ones of the other organs, and higher sensitivity to the metabolism of the *trans* isomer compared to the *cis* one (Scollon *et al.*, 2009; Tornero-Velez *et al.*, 2012). The concentrations in *trans*-permethrin were overpredicted in fat with the estimated value of hepatic clearance of *trans*-permethrin. Values of *in vivo* hepatic clearances in rats of the both isomers were previously published. They were estimated either on the extrapolation of *in vitro* metabolic data obtained on rat microsomes to *in vivo* or either on the optimization of these extrapolated values to fit the measured concentrations in rats (Scollon *et al.*, 2009; Tornero-Velez *et al.*, 2012). Our estimated values of *in vivo* hepatic clearances were lower than those obtained in these two studies for *trans*-permethrin (respectively from 2.3 to 5.7-ratio) but respectively similar and lower (2.7-factor) for *cis*-permethrin. The relationship between the hepatic clearance values of the both isomers with a 1.9-factor in our experiment is also lower to the ratio of 2.8 observed by Scollon *et al.* (2009) and 3.9 described by Tornero-Velez *et al.* (2012) following an exposition to a mixture of permethrin isomers. The *in vivo* clearances of permethrin may differ from the *in vitro* results due to the release of the insecticide from fat to blood. The exposure to a mixture of isomers in the *in vivo* studies instead of the separate forms may also interfere in the kinetic of elimination. However the calibrated PBPK model reproduced the kinetics of permethrin in most of the matrices.

The first quantification of the *in vivo* formation of the metabolites of permethrin shows a high and similar rates of formation between DCCA and 4'-OH-PBA compared to 3-PBA. The estimated kinetic profiles of DCCA in blood and liver are in a good agreement with the observed concentrations. The estimated amounts in each metabolite in urine reached the observed steady-state at the end of the

excretion. Amounts in metabolites 4'-OH-PBA, DCCA and 3-PBA detected in urine at the end of the excretion represent respectively 84%, 14% and 2% for the *cis* isomer and 70%, 23% and 7% for the *trans* isomer of the sum of the amounts of the three metabolites. Although a large number of metabolites were dosed in their study, Gaughan *et al.* (1977) already observed a high recovery of 4'-OH-PBA of 43 % for *trans*-permethrin and 29 % for *cis*-permethrin after administration of permethrin radiolabeled on the alcohol moiety.

The simulations the calibrated PBPK model on another dataset highlight the impact of the absorption on the kinetic of permethrin. The results of the sensitivity analysis performed on deltamethrin by Mirfazaelian *et al.* (2006) already underlined that blood and brain concentrations in deltamethrin were very sensitive to the value of the stomach-intestinal constant (K_{si}) and intestinal constant (K_{int}). The setting of these absorption parameters to the values estimated by Tornero-Velez *et al.* (2012) improves the quality of the predicted concentrations. Our PBPK model, with our estimated values of parameters, except absorption, allows a correct reproduction of the permethrin kinetics in blood, brain, liver and fat. The fit of the predicted concentrations to the observed ones, especially in blood for both isomers at the different doses, were even improved compared to the predictions described by Tornero-Velez *et al.* (2012). The over prediction in fat is recovered for *trans*-permethrin at the high dose of 6 mg/kg, which is consistent with the results of the calibration of our PBPK model. Thus a part of the PBPK model developed in this study was verified. Finally, the final structure of the model of permethrin and the values of the estimated parameters are similar to ones described in previous studies on deltamethrin and permethrin (Mirfazaelian *et al.*, 2006; Godin *et al.*, 2010; Tornero-Velez *et al.*, 2012). A generic model of pyrethroids may be considered for the parent compound.

Conclusion

A link was established between urine biomarkers 3-PBA, *cis*- and *trans*-DCCA and internal and external dose of exposure of separate isomers *cis*- and *trans*-permethrin by the calibration of a PBPK model of the parent compounds and their associated metabolites based on *in vivo* data. Bayesian calibration allows quantifying variability on estimated parameters such as liver clearances and rate of formation of metabolites and excretion to urine. This PBPK model can be then extrapolated to humans to quantify human internal exposure and to be used in a biomonitoring framework.

Acknowledgements

This work was supported by the foundation of the University of Technology in Compiègne "La Fondation UTC pour l'Innovation" (Project ToxOnChip) and the French Ministry of Ecology and Sustainable Development.

References

- Anadon, A., Martinezlarranaga, M. R., Diaz, M. J., and Bringas, P. (1991). Toxicokinetics of Permethrin in the Rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **110**, 1-8.
- ATSDR (2003). Toxicological profile for pyrethrins and pyrethroids. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- Barr, D. B., Baker, S. E., Whitehead, R. D., Wong, L., and Needham, L. L. (2010). Urinary Concentrations of Pyrethroid Metabolites in the General US Population, NHANES 1999-2002. *Epidemiology* **19**, S192-S193.
- Bois, F. Y., and Mazle, D. R. (1997). MCSim: A Monte Carlo Simulation Program. *J Stat Softw* **2**.
- Bradberry, S. M., Cage, S. A., Proudfoot, A. T., and Vale, J. A. (2005). Poisoning due to pyrethroids. *Toxicol rev* **24**, 93-106.
- Brown, R. P., Delp, M. D., Lindstedt, S. L., Rhomberg, L. R., and Beliles, R. P. (1997). Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models. *Toxicol Ind Health* **13**, 407-484.
- Choi, J., Rose, R. L., and Hodgson, E. (2002). In vitro human metabolism of permethrin: the role of human alcohol and aldehyde dehydrogenases. *Pestic Biochem Phys* **74**, 117-128.
- Côté, J., Bonvalot, Y., Carrier, G., Lapointe, C., Fuhr, U., Tomalik-Scharte, D., Wachall, B., and Bouchard, M. (2014). A Novel Toxicokinetic Modeling of Cypermethrin and Permethrin and Their Metabolites in Humans for Dose Reconstruction from Biomarker Data. *Plos One* **9**.
- Crow, J. A., Borazjani, A., Potter, P. M., and Ross, M. K. (2007). Hydrolysis of pyrethroids by human and rat tissues: Examination of intestinal, liver and serum carboxylesterases. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **221**, 1-12.
- Davis, J., Tornero-Velez, R., and Setzer, R. W. (2012). Computational Approaches for Developing Informative Prior Distributions for Bayesian Calibration of PBPK Models In *Parameters for Pesticide QSAR and PBPK/PD Models for Human Risk Assessment* (J. B. Knaak, C. Timchalk, and R. Tornero Velez, Eds.). ACS Publications, Washington.
- Flannigan, S. A., Tucker, S. B., Key, M. M., Ross, C. E., Fairchild, E. J., Grimes, B. A., and Harrist, R. B. (1985). Synthetic Pyrethroid Insecticides - a Dermatological Evaluation. *Br J Ind Med* **42**, 363-372.
- Fortin, M. C., Carrier, G., and Bouchard, M. (2008). Concentrations versus amounts of biomarkers in urine: a comparison of approaches to assess pyrethroid exposure. *Environ. Health* **7**, 13.
- Gaughan, L. C., Unai, T., and Casida, J. E. (1977). Permethrin Metabolism in Rats. *J Agric Food Chem* **25**, 9-17.
- Gelman, A., Meng, X. L., and Stern, H. (1996). Posterior predictive assessment of model fitness via realized discrepancies. *Stat Sinica* **6**, 733-760.
- Godin, S. J., DeVito, M. J., Hughes, M. F., Ross, D. G., Scollon, E. J., Starr, J. M., Setzer, R. W., Conolly, R. B., and Tornero-Velez, R. (2010). Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling of Deltamethrin: Development of a Rat and Human Diffusion-Limited Model. *Toxicol Sci* **115**, 330-343.
- Gotoh, Y., Kawakami, M., Matsumoto, N., and Okada, Y. (1998). Permethrin emulsion ingestion: Clinical manifestations and clearance of isomers. *J Toxicol-Clin Toxic* **36**, 57-61.
- He, F. S., Wang, S. G., Liu, L. H., Chen, S. Y., Zhang, Z. W., and Sun, J. X. (1989). Clinical Manifestations and Diagnosis of Acute Pyrethroid Poisoning. *Arch Toxicol* **63**, 54-58.
- Heudorf, U., Butte, W., Schulz, C., and Angerer, J. (2006). Reference values for metabolites of pyrethroid and organophosphorous insecticides in urine for human biomonitoring in environmental medicine. *Int J Hyg Envir Heal* **209**, 293-299.
- Hirosawa, N., Ueyama, J., Kondo, T., Kamijima, M., Takagi, K., Fujinaka, S., Hirate, A., Hasegawa, T., and Wakusawa, S. (2011). Effect of DDVP on urinary excretion levels of pyrethroid metabolite 3-phenoxybenzoic acid in rats. *Toxicol Lett* **203**, 28-32.

- Imai, K., Yoshinaga, J., Yoshikane, M., Shiraishi, H., Mieno, M. N., Yoshiike, M., Nozawa, S., and Iwamoto, T. (2014). Pyrethroid insecticide exposure and semen quality of young Japanese men. *Reprod Toxicol* **43**, 38-44.
- Jin, Y. X., Liu, J. W., Wang, L. G., Chen, R. J., Zhou, C., Yang, Y. F., Liu, W. P., and Fu, Z. W. (2012). Permethrin exposure during puberty has the potential to enantioselectively induce reproductive toxicity in mice. *Environ Int* **42**, 144-151.
- Le Grand, R., Dulaurent, S., Gaulier, J. M., Saint-Marcoux, F., Moesch, C., and Lachat, G. (2012). Simultaneous determination of five synthetic pyrethroid metabolites in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Application to 39 persons without known exposure to pyrethroids. *Toxicol Lett* **210**, 248-253.
- Leng, G., and Gries, W. (2005). Simultaneous determination of pyrethroid and pyrethrin metabolites in human urine by gas chromatography-high resolution mass spectrometry. *J Chromatogr B* **814**, 285-294.
- Lequesne, P. M., Maxwell, I. C., and Butterworth, S. T. G. (1981). Transient Facial Sensory Symptoms Following Exposure to Synthetic Pyrethroids - a Clinical and Electro-Physiological Assessment. *Neurotoxicology* **2**, 1-11.
- Lestremau, F., Willemin, M.-E., Chatellier, C., Desmots, S., and Brochot, C. (2014). Determination of cis-permethrin, trans-permethrin and associated metabolites in rat blood and organs by gas chromatography-ion trap mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **406**, 3477-3487.
- Meeker, J. D., Barr, D. B., and Hauser, R. (2008). Human semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary metabolites of pyrethroid insecticides. *Hum Reprod* **23**, 1932-1940.
- Mikata, K., Isobe, N., and Kaneko, H. (2012). Biotransformation and enzymatic reactions of synthetic pyrethroids in mammals. *Top curr chem* **314**, 113-135.
- Mirfazaelian, A., Kim, K. B., Anand, S. S., Kim, H. J., Tornero-Velez, R., Bruckner, J. V., and Fisher, J. W. (2006). Development of a physiologically based pharmacokinetic model for deltamethrin in the adult male Sprague-Dawley rat. *Toxicol Sci* **93**, 432-442.
- Morgan, M. K. (2012). Children's Exposures to Pyrethroid Insecticides at Home: A Review of Data Collected in Published Exposure Measurement Studies Conducted in the United States. *Int J Environ Res Public Health* **9**, 2964-2985.
- Nakamura, Y., Sugihara, K., Sone, T., Isobe, M., Ohta, S., and Kitamura, S. (2007). The in vitro metabolism of a pyrethroid insecticide, permethrin, and its hydrolysis products in rats. *Toxicology* **235**, 176-184.
- Ross, M. K., Borazjani, A., Edwards, C. C., and Potter, P. M. (2006). Hydrolytic metabolism of pyrethroids by human and other mammalian carboxylesterases. *Biochem Pharmacol* **71**, 657-669.
- Schoeffner, D. J. (1999). Organ weights and fat volume in rats as a function of strain and age. *J Toxicol Env Heal A* **56**, 449-462.
- Scollon, E. J., Starr, J. M., Godin, S. J., DeVito, M. J., and Hughes, M. F. (2009). In Vitro Metabolism of Pyrethroid Pesticides by Rat and Human Hepatic Microsomes and Cytochrome P450 Isoforms. *Drug Metab Dispo* **37**, 221-228.
- Soderlund, D. M., Clark, J. M., Sheets, L. P., Mullin, L. S., Piccirillo, V. J., Sargent, D., Stevens, J. T., and Weiner, M. L. (2002). Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology* **171**, 3-59.
- Starr, J. M., Graham, S. E., Ross, D. G., Tornero-Velez, R., Scollon, E. J., DeVito, M. J., Crofton, K. M., Wolansky, M. J., and Hughes, M. F. (2014). Environmentally relevant mixing ratios in cumulative assessments: A study of the kinetics of pyrethroids and their ester cleavage metabolites in blood and brain; and the effect of a pyrethroid mixture on the motor activity of rats. *Toxicology* **320**, 15-24.
- Starr, J. M., Scollon, E. J., Hughes, M. F., Ross, D. G., Graham, S. E., Crofton, K. M., Wolansky, M. J., DeVito, M. J., and Tornero-Velez, R. (2012). Environmentally Relevant Mixtures in Cumulative Assessments: An Acute Study of Toxicokinetics and Effects on Motor Activity in Rats Exposed to a Mixture of Pyrethroids. *Toxicol Sci* **130**, 309-318.

- Stout, D. M., II, Bradham, K. D., Egeghy, P. P., Jones, P. A., Croghan, C. W., Ashley, P. A., Pinzer, E., Friedman, W., Brinkman, M. C., Nishioka, M. G., and Cox, D. C. (2009). American Healthy Homes Survey: A National Study of Residential Pesticides Measured from Floor Wipes. *Environ Sci Technol* **43**, 4294-4300.
- Takaku, T., Mikata, K., Matsui, M., Nishioka, K., Isobe, N., and Kaneko, H. (2011). In Vitro Metabolism of trans-Permethrin and Its Major Metabolites, PBalc and PBacid, in Humans. *J Agric Food Chem* **59**, 5001-5005.
- Tornero-Velez, R., Davis, J., Scollon, E. J., Starr, J. M., Setzer, R. W., Goldsmith, M.-R., Chang, D. T., Xue, J., Zartarian, V., DeVito, M. J., and Hughes, M. F. (2012). A Pharmacokinetic Model of cis- and trans-Permethrin Disposition in Rats and Humans With Aggregate Exposure Application. *Toxicol Sci* **130**, 33-47.
- Ueyama, J., Saito, I., and Kamijima, M. (2010). Analysis and evaluation of pyrethroid exposure in human population based on biological monitoring of urinary pyrethroid metabolites. *J Pestic Sci* **35**, 87-98.
- US EPA (2005). Overview of Permethrin Risk Assessment. U.S. Environmental Protection Agency.
- US EPA (2011). Pesticides Industry Sales and Usage : 2006 and 2007 Market Estimates. U.S. Environmental Protection Agency, Washington.
- Verschöyle, R. D., and Aldridge, W. N. (1980). Structure-Activity-Relationships of Some Pyrethroids in Rats. *Arch Toxicol* **45**, 325-329.
- Waites, G. M. (1991). Thermoregulation of the scrotum and testis: studies in animals and significance for man. *Adv Exp Med Biol* **286**, 9-17.
- Wei, B., Isukapalli, S. S., and Weisel, C. P. (2013). Studying permethrin exposure in flight attendants using a physiologically based pharmacokinetic model. *J Expo Sci Environ Epidemiol* **23**, 416-427.
- Wolansky, M. J., and Harrill, J. A. (2008). Neurobehavioral toxicology of pyrethroid insecticides in adult animals: A critical review. *Neurotoxicology and Teratology* **30**, 55-78.
- Woollen, B. H., Marsh, J. R., Laird, W. J. D., and Lesser, J. E. (1992). The Metabolism of Cypermethrin in Man - Differences in Urinary Metabolite Profiles Following Oral and Dermal Administration. *Xenobiotica* **22**, 983-991.
- Young, H. A., Meeker, J. D., Martenies, S. E., Figueroa, Z. I., Barr, D. B., and Perry, M. J. (2013). Environmental exposure to pyrethroids and sperm sex chromosome disomy: a cross-sectional study. *Environmental Health* **12**.
- Zhang, S.-Y., Ueyama, J., Ito, Y., Yanagiba, Y., Okamura, A., Kamijima, M., and Nakajima, T. (2008). Permethrin may induce adult male mouse reproductive toxicity due to cis isomer not trans isomer. *Toxicology* **248**, 136-141.
- Zhang, S. Y., Ito, Y., Yamanoshita, O., Yanagiba, Y., Kobayashi, M., Taya, K., Li, C., Okamura, A., Miyata, M., Ueyama, J., Lee, C. H., Kamijima, M., and Nakajima, T. (2007). Permethrin may disrupt testosterone biosynthesis via mitochondrial membrane damage of leydig cells in adult male mouse. *Endocrinology* **148**, 3941-3949.

III. QUANTIFICATION *IN VITRO* DU METABOLISME HEPATIQUE DE LA PERMETHRINE ET DES SES METABOLITES CHEZ L'HOMME

Soumis à *Toxicology in vitro*

Le métabolisme hépatique de la perméthrine chez l'homme a été caractérisé dans des conditions adéquates pour l'extrapolation *in vitro-in vivo* des données. Les vitesses de disparition de la *cis*- et *trans*-perméthrine et d'apparition des métabolites *cis*- et *trans*-DCCA et 3-PBA ont été quantifiées simultanément sur des hépatocytes primaires humains. Les isomères de la perméthrine ont été incubés séparément et en mélange.

Avant la mise en place des expériences de cinétique, les phénomènes d'adsorption du composé sur le matériel d'étude ont été évalués. De plus l'activité spécifique des enzymes impliquées dans le métabolisme de la perméthrine (carboxylestérases, CYP3A4, CYP2C19) a été quantifiée pour le lot d'hépatocytes. Deux types d'approches ont été utilisés pour déterminer le métabolisme des isomères de la perméthrine et de ses métabolites. Une cinétique sur 3 temps (30, 60 et 180 min) à différentes concentrations en composé parent (de 5 à 125 μM) a été réalisée pour la *cis*- et *trans*-perméthrine, le *cis* et *trans*-DCCA et le 3-PBA. Une cinétique plus longue pour ces composés a été effectuée à des concentrations d'incubation en *cis* et *trans*-perméthrine inférieures à leur valeur de K_m , aux temps 10 min, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 8 h et 17 h. Les composés parents ont été incubés séparément et en mélange (ratio 40:60). Les valeurs des paramètres V_{max} , K_m et le ratio V_{max}/K_m ont été estimées à partir de l'ensemble des données acquises lors de l'incubation du composé seul, dans un contexte Bayésien. Seules la clairance et la vitesse de formation intrinsèque ont été déterminées lors de l'incubation des composés en mélange. Ces études ont été complétées par la co-incubation d'une concentration unique en *trans*-perméthrine (ou *cis*-perméthrine) (5 μM) avec des concentrations croissantes en *cis*-perméthrine (ou *trans*-perméthrine) (0,5 à 125 μM). L'ensemble des vitesses a ensuite été extrapolé à l'homme.

L'adsorption dans le puits s'avère négligeable grâce à la présence de sérum dans le milieu d'incubation. La perméthrine s'adsorbant sur les parois du tube de la solution d'incubation, un aliquot a été réalisé au début de l'expérience pour déterminer la concentration initiale dans le milieu. La *trans*-perméthrine est métabolisée trois plus vite que la *cis*-perméthrine. La vitesse de formation du DCCA est similaire à celle du 3-PBA et à celle de disparition du composé parent respectif (hormis pour l'isomère *trans*). La co-incubation de perméthrine dans un rapport 40:60 des isomères *cis/trans* n'a pas d'impact sur les vitesses de métabolisme des composés. Ces résultats indiquent une absence d'interaction entre les deux isomères dans ces conditions. Les vitesses de métabolisme pourront servir de données d'entrée pour un modèle PBPK de la perméthrine chez l'homme.

***In vitro* human metabolism of permethrin isomers alone or as a mixture and the formation of the major metabolites in cryopreserved primary hepatocytes**

Marie-Emillie Willemin^{1,2}, Ali Kadar³, Georges de Sousa³, Eric Leclerc², Roger Rahmani³, Céline Brochot *¹

¹ Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), Unité Modèles pour l'Ecotoxicologie et la Toxicologie (METO), Parc ALATA BP2, 60550 Verneuil en Halatte, France

² Université de Technologie de Compiègne, CNRS UMR 7338, Laboratoire de Biomécanique et Bioingénierie, rue du Docteur Schweitzer, France

³ Institut de Recherche sur l'Agronomie (INRA), UMR 1331 TOXALIM, 400 route des Chappes, BP167, 06903, Sophia Antipolis, France

Soumis à *Toxicology in vitro*

Abstract

In vitro metabolism of permethrin, a pyrethroid insecticide, was assessed in primary human hepatocytes. *In vitro* kinetic experiments were performed to estimate the Michaelis-Menten parameters and the clearances or formation rates of the permethrin isomers (*cis*- and *trans*-) and three metabolites, *cis*- and *trans*-3-(2,2 dichlorovinyl)-2,2-dimethyl-(1-cyclopropane) carboxylic acid (*cis*- and *trans*-DCCA) and 3-phenoxybenzoic acid (3-PBA). Non-specific binding and the activity of the enzymes involved in permethrin's metabolism (cytochromes P450 and carboxylesterases) were quantified. *Trans*-permethrin was cleared more rapidly than *cis*-permethrin (25.7 ± 0.6 and $10.1 \pm 0.3 \mu\text{L}/\text{min}/10^6$ cells respectively) with a 2.6-factor. A 3-factor was observed between the formation rates of DCCA and 3-PBA obtained from *trans*- and *cis*-permethrin. For both isomers, the rate of formation of DCCA was higher than the one of 3-PBA. The metabolism of the isomers in mixture was also quantified. The co-incubation of isomers at different ratios showed the low inhibitory potential of *cis*- and *trans*-permethrin on each other. The estimates of the clearances and the formation rates in the co-incubation condition did not differ from the estimates obtained with a separate incubation. These metabolic parameters may be integrated in physiologically based pharmacokinetic (PBPK) models to predict the fate of permethrin and metabolites in the human body.

Keywords: carboxylesterases; cytochrome P450; drug-drug interactions; environmental toxicology; enzyme kinetics; gas chromatography/GC/MS; hepatocytes; in vitro-in vivo prediction (IVIVE); modeling and simulation

III. QUANTIFICATION IN VITRO DU METABOLISME HEPATIQUE DE LA PERMETHRINE ET DES SES METABOLITES CHEZ L'HOMME

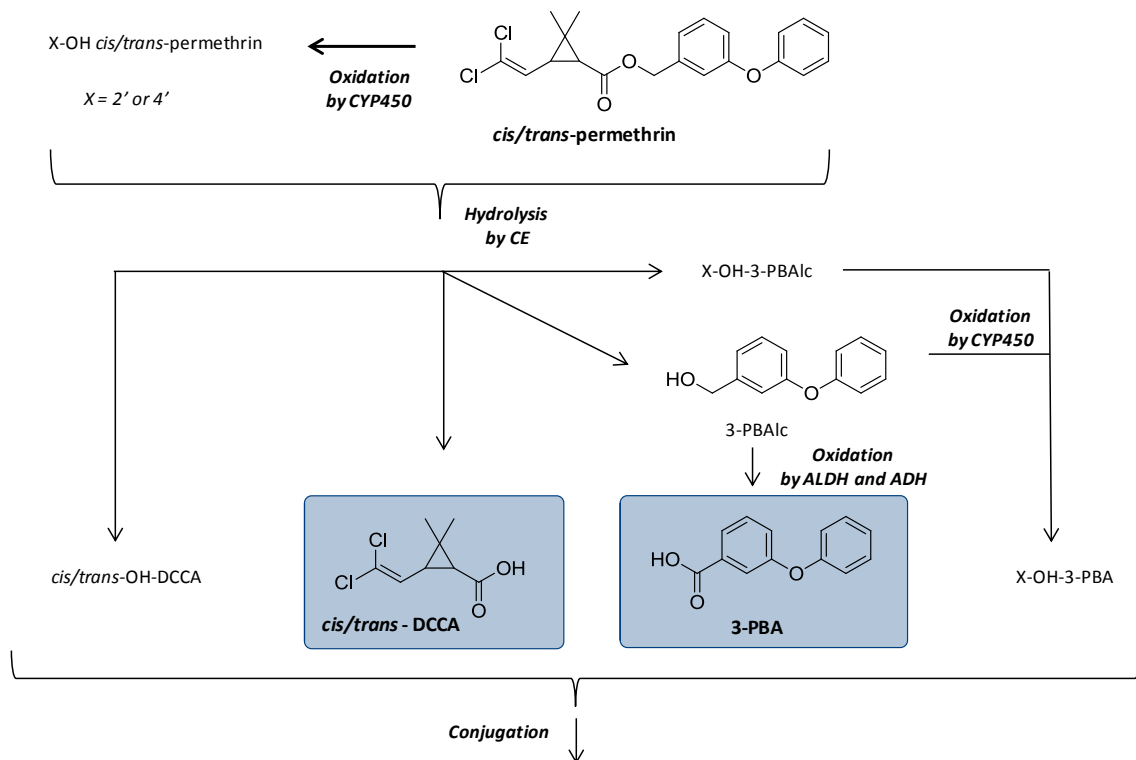


Figure 39. A simplified representation of the pathways of metabolism of *cis*-permethrin and *trans*-permethrin into the metabolites *cis/trans*-DCCA and 3-PBA commonly dosed in biomonitoring studies. Derived from Scollon et al. (2009), Ross et al. (2006), Choi et al. (2002), Takaku et al. (2011)

Introduction

Permethrin, a synthetic pyrethroid insecticide, is widely used under different forms in house treatment and agriculture (Stout et al., 2009; US EPA, 2011). As a consequence, humans are frequently exposed to this insecticide, confirmed by the detection of urinary permethrin metabolites in children and adults in biomonitoring studies (Barr et al., 2010; Ueyama et al., 2010). Permethrin is suspected to induce neuronal disturbances such as paresthesia or headaches (Bradberry et al., 2005) and was also associated to modifications of the human semen quality (Meeker et al., 2008; US EPA, 2011; Young et al., 2013; Imai et al., 2014). Since the active form is the parent compound, the quantification of metabolism, the only route of elimination from the circulatory system, is required to assess the internal exposure in humans.

The metabolic pathway of the two isomers *cis* and *trans* of permethrin in mammals was previously identified by Gaughan et al. (1977). In humans, permethrin can be hydrolyzed by carboxylesterases (CE) or oxidized by cytochromes P450 (CYP) directly into the metabolites *cis*- or *trans*-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethyl-(1-cyclopropane) carboxylic acid (*cis*- and *trans*-DCCA), specific to each isomer, and into the (un)oxidized form of 3-phenoxybenzoic alcohol (3-PBAc) (Crow et al., 2007). Several steps of oxidation by alcohol or aldehyde deshydrogenases occur and lead to obtain the final metabolite 3-phenoxybenzoic acid (3-PBA) common to both isomers (Choi et al., 2002). DCCA and 3-PBA can finally be conjugated by phase II enzymes (Takaku et al., 2011; Mikata et al., 2012). Figure 39 represents a simplified metabolic pathway with the involved enzymes.

Metabolism in humans is usually predicted using *in vitro* models coupled to methodologies for *in vitro/in vivo* extrapolation (Lave et al., 1999; Obach, 1999; Hallifax et al., 2005; Riley et al., 2005; Rostami-Hodjegan and Tucker, 2007). The main sites of metabolism of permethrin and the enzymes involved in humans has been established using microsomes, recombinant cells expressing CYPs and CEs (Nishi et al., 2006; Ross et al., 2006; Crow et al., 2007; Scollon et al., 2009; Yang et al., 2009; Takaku et al., 2011; Lavado et al., 2014). In humans, the liver is the major site of metabolism of permethrin with the highest abundance of esterases and CYPs (Crow et al., 2007). In their study, Scollon et al. (2009) quantified the hepatic metabolic rates for *cis*- and *trans*-permethrin using microsomes including the hydrolysis and the oxidation pathways. *Trans*-permethrin was eliminated faster than *cis*-permethrin (by a 12-factor) and a reduced metabolic rates (about a 2-factor) during the co-incubation of the two isomers was observed suggesting an interaction between the *cis*- and *trans*-permethrin (Tornero-Velez et al., 2012).

In vitro metabolic rates provide valuable and quantitative knowledge that can be extrapolated to *in vivo* situations and then be integrated in toxicokinetic models to simulate the fate of the compound in the human body. The quality of the *in vitro/in vivo* extrapolation relies mainly on the choice of the *in vitro* model for the compounds of interest, the experimental settings and the analysis of the kinetic data (McMullin et al., 2007; Pelkonen and Turpeinen, 2007). Several *in vitro* models are preferably used to derive the metabolic rates such as microsomes, liver slices or primary hepatocytes (Lipscomb and Poet, 2008). The use of primary hepatocytes which closely reflect *in vivo* conditions by containing all the physiological factors (Hewitt et al., 2007; Yoon et al., 2012) has already proven in the increase of the quality of predictions of the hepatic clearance for several drugs (Brown et al., 2007b). In the case of permethrin, the cytosolic fraction of hepatocytes also contains esterases that could participate to metabolism (Crow et al., 2007). Cryopreserved hepatocytes are now routinely used

since their activity and stability are similar to fresh hepatocytes (McGinnity et al., 2004). Other experimental conditions like the addition of serum in the medium to mimic *in vivo* equilibrium (Blanchard et al., 2004; Li, 2007) and evaluation of non specific binding, especially for lipophilic compounds such as permethrin, have to be considered to improve the quality of the extrapolation (Ouattara et al., 2011; Groothuis et al., 2013) .

In the present study, we propose to determine in representative conditions for *in vitro/in vivo* extrapolation the Michaelis-Menten parameters of the depletion of *cis*- and *trans*-permethrin and the effect of co-incubation of both isomers on human primary hepatocytes. The rates of formation of metabolites *cis*- and *trans*-DCCA and 3-PBA will be also estimated. The depletion and formation rates will be extrapolated to *in vivo* rates in order to be used for the calibration of toxicokinetic models.

Experimental

Chemicals

Cis-permethrin (*cis*-P) (3-phenoxybenzyl(1*RS*)-*cis*-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate, purity, 99.4% purity) and *trans*-permethrin (*trans*-P) (3-phenoxybenzyl (1*RS*)-*trans*-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate, 99% purity) were obtained respectively from ChemService (West Chester, USA) and Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). The internal standards *cis*-[¹³C₆]permethrin (98% purity), *trans*-[¹³C₂]DCCA (98% purity) and [¹³C₆]3-PBA (98% purity), were purchased from LGC standard (Cambridge Isotope Laboratories, USA). S-[4-¹⁴C]mephenytoin (56 mCi/mmol) was provided by Amersham Life sciences (Velizy-Villacoublay, France). Midazolam (25 mCi/mmol) was kindly offered by Hoffman-La Roche (Bâle, Switzerland). 4-para-nitrophenyl acetate (PNPA) (esterase substrate) and its metabolite 4-para-nitrophenol (PNP) were supplied by Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France).

Human primary hepatocytes preparation

Cryopreserved human primary hepatocytes were thawed as previously described by de Sousa et al. (1997). The human hepatocytes from three donors (two females, one male) were placed into 48-wells Corning® Costar® plates (about 0.7×10⁵ cells/well) (Corning, NY, USA) in an atmosphere of 5% CO₂ and 95% relative humidity. After 30 min, the medium in each well was removed and replaced by 200 µL of the medium used for experiments, corresponding to Williams E medium containing 10% of fetal bovine serum (FBS), 1 X of a mix of insulin, selenium and transferrine (Life Technologies, Saint – Aubin, France) and 0.5% of a mix of streptomycine (10,000 µg/mL) and penicillin (10,000 unit/mL). Experiments with chemicals were performed 24 hours later.

Previously to the first experiments, the permethrin stability in the incubation medium was evaluated since permethrin could potentially be metabolized by enzymes contained in FBS. *Trans*-permethrin (5 µM), the most rapidly metabolized compound, was incubated with the medium with 10% of FBS and 100% of FBS during 3 h à +37°C. No depletion was observed.

Non-specific binding

The non-specific binding of *cis*- and *trans*-permethrin on plastic containers was assessed i) on tubes in which incubation mediums were prepared and ii) on wells containing cells. For both systems, a low (5 μM) and a high (125 μM) concentration were tested ($n = 3$ for each condition). Firstly, incubation mediums were prepared in polypropylene tubes and heated at +37°C. A 200 μL aliquot was taken after 10 and 15 min, and then every 15 min during 1 hour. The recovery of permethrin was computed as the ratio of the peak area of the compound in the sample taken from the tube over the peak area of the standard solutions prepared in the extract blank matrix at the same theoretical level. Secondly, the non-specific binding in wells was tested to evaluate the binding of the compounds on the walls and on the cell membrane, conditions similar to the ones of the kinetic experiments. After 3 hours of exposure at room temperature, the medium and the cells were recovered and 200 μL of medium were added to rinse the well. A second wash was performed by adding 200 μL of methanol (MeOH) twice to recover bound permethrin. To take account of the endothermic property of binding to the devices, a control test was also performed with permethrin in a well without cells at 37°C during 1 hour. The percentage of recovery was computed as the ratio of the amount of permethrin in the organic phase over the sum of the amount of permethrin in the organic and aqueous phases. Corning® DeckWorks™ (Sigma-Aldrich) tips with low binding for biological proteins were used for all experiments.

Specific activity of CYPs and esterases

The CYP and esterase activities of the human hepatocyte pool were evaluated using adequate substrates. Human CYP2C19 and CYP3A4 were selected since they showed high activities toward permethrin and pyrethroids (Scollon et al. 2009). The hepatocyte pool was characterized using isoform-selective substrates: (S)-mephenytoin for CYP2C19 and midazolam for CYP3A4 (Yuan et al. 2002). The substrates were incubated with hepatocytes at 1 μM during 17 h for (S)-mephenytoin and 5 μM during 6 h for midazolam ($n = 3$). Preliminary tests were performed to define the incubation times (data not shown). The reactions were terminated by the addition of 200 μL of acetonitrile (AcN). The activities were computed as the amount of free 4'-hydroxymephenytoin produced, a metabolite of (S)-mephenytoin, and as the amount of midazolam metabolized at the end of experiment.

The esterase activity was assessed using the formation of PNP from PNPA (Chanda et al. 1997) A solution of 200 μM of PNPA prepared in phosphate buffered saline (PBS) buffer (Sigma Aldrich) was incubated in triplicate after rinsing the well twice with 200 μL of PBS. The reaction was stopped after 3 min by adding 200 μL of iced AcN. The content of each well was recovered, diluted in 400 μL of PBS and then centrifuged during 1 min at +4°C. A control well without cells was tested. The specific activity was computed as the amount of PNP produced at the end of the experiment.

Design of experiments

The stock solutions of permethrin were prepared in DMSO and diluted 200 times in medium with 10% of FBS so that the solvent does not exceed 0.5% of the total volume. The solution containing permethrin was incubated in a polypropylene tube for 10 min at +37°C. Then 200 μL of the solution were incubated with about 0.7×10^5 hepatocytes per well. At the end of the experiments, the reactions were stopped by the addition of 200 μL of iced MeOH. The cell number was counted in two

III. QUANTIFICATION IN VITRO DU METABOLISME HEPATIQUE DE LA PERMETHRINE ET DES SES METABOLITES CHEZ L'HOMME

wells per plate. The cells were fixed with iced MeOH during 2-3 min and colored by the fluorescent dye HOESCHST 33342 (Sigma Aldrich) diluted at 1/10,000 in phosphate buffer and adherent cells were counted by using an Arrayscan XTI (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). Viable cells were distinguished from dead cells based on the size and the intensity produced by the fluorochrome of their nucleus. Experiments were carried out in triplicate.

For Michaelis-Menten experiments, *cis*- or *trans*-permethrin was incubated with the human cryopreserved hepatocytes at 8 concentrations (1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 and 125 μM). Reactions were stopped at 30 min, 1 h and 3 h. These experiments were performed twice on two different days. In addition, *cis*- and *trans*-permethrin were incubated alone, respectively at 2 μM and 3 μM , to follow the kinetics of the parent compounds and the metabolites over a long-time period. The compounds were dosed at 10 min, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 8 h and 17 h.

The impact of incubating the mixture of *cis*- and *trans*-permethrin on the metabolism of both isomers was studied. A single concentration of 5 μM of *cis*-permethrin (respectively *trans*-permethrin) was incubated with 9 concentrations (0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 125 μM) of *trans*-permethrin (respectively *cis*-permethrin). Reactions were stopped 1 h and 3 h after the beginning of the experiment for *trans*-permethrin, and 2 h and 4 h after the beginning of the experiment for *cis*-permethrin as the metabolism of this latter is known to be slower than the one of *trans*-permethrin. In addition, a representative time-course of a mixture of both isomers at 5 μM (ratio *cis/trans* 40:60) was conducted and the compounds were dosed at 10 min, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 8 h and 17 h.

Sample analysis

The quantification of *cis*- and *trans*-permethrin and their respective metabolite DCCA and 3-PBA was performed by GC-MS using a method adapted from Lestremieu et al. (2014). Briefly, the medium and the cells were transferred to a 1.5 mL Eppendorf® tubes (Montesson, France). In addition the 200 μL of MeOH added to rinse the well were also recovered. *Cis*- $^{13}\text{C}_6$]permethrin, *trans*- $^{13}\text{C}_2$]DCCA, $^{13}\text{C}_6$]3-PBA (final concentration 1 μM) internal standards, 200 μL of MeOH and 200 μL of chlorhydric acid (HCl, 10 M) were added to the sample. A 15 min of incubation at 80°C allowed the derivatization of the target compounds before the liquid-liquid extraction of all the compounds samples with 600 μL of toluene. A GC-MS using a TRACE GC Ultra gas chromatograph coupled to a DSQ II single quadrupole mass spectrometer was used. The separation of the compounds was accomplished on a TRACE TR5-MS (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) capillary column (30 m \times 0.25 mm, i.d., 0.25 μm film thickness). The injection volume was 1 μL . Matrix matched standard solutions were prepared in and analyzed for the parent compounds (0.025 μM to 5 μM and 5 μM to 20 μM) and the metabolites (0.025 μM to 15 μM). The instrumental limit of quantification was 0.025 μM for all the studied analytes. Spontaneous formation of DCCA was observed during the derivation step in the medium without hepatocytes. To quantify the amount of DCCA formed only by the metabolism of permethrin on hepatocytes, measured concentrations of DCCA in samples were corrected by the percent of DCCA recovered in the medium without hepatocytes prepared at the beginning of the experiment.

The elution of the samples containing midazolam and (S)-mephénytoïne was performed with acetate buffer 20 mM (pH = 4.5) and a mix 25/75 of MeOH/AcN. Free 4'-hydroxymephénytoïn and midazolam were analyzed with a Synergi 4 μm Hydro-RP 80 Å (250 \times 4.6 mm) (Phenomenex, Le Pecq, France) by a Dionex liquid chromatography with a P580 pump and an UVD 3405 coupled with flow

scintillation analyzer 500 TR Series (Packard Biosciences Company, CT, USA). The amount of PNP formed was measured at 405 nm with a spectrophotometer Cary 300 Scan (Varian, CA, USA) and interpreted by a calibration curve of absorbance of PNP vs concentrations in PNP (25 to 200 μM) prepared in the same conditions than the samples.

Data analysis

All the kinetic data generated for one compound in similar incubation experiments (*i.e.*, alone or in mixture) were analyzed together. The Michaelis-Menten equation was used to analyze these data. Apparent V_{max} and K_m were determined for the depletion of *cis*- and *trans*-permethrin:

$$\frac{dC(t)}{dt} = -\frac{V_{max} \times C(t)}{K_m + C(t)} \quad (1)$$

with C the concentration of the parent compound in the well content. The Michaelis-Menten parameters for the formation of the metabolites were estimated using:

$$\frac{dC_{Met}(t)}{dt} = \frac{V_{max_{Met}} \times C(t)}{K_{m_{Met}} + C(t)} \quad (2)$$

with C_{Met} the concentration of the metabolites. The mixture of permethrin was tested at one concentration below K_m , so only the ratio V_{max}/K_m was estimated. The estimated *in vitro* intrinsic clearances CL_{int} (V_{max}/K_m) were apportioned to the volume of the well content (about 200 μL) (McGinnity et al. 2004; Obach 1999) and then were scaled to *in vivo* CL_{int} (units, mL/min/kg) using average physiological parameters, the hepatocellularity 99×10^6 cells/g of liver (Barter et al. 2007) and the human liver weight 26 g/kg of body weight (Davies and Morris 1993).

Statistical analysis

As described above, two experiments were performed for the isomers incubated alone. The rates of depletion of the parent compound and the rates of formation of the metabolites were determined over a short period (up to 3 hour) to determine Michaelis-Menten parameters for each compound, and a kinetic of the same compounds were followed over a long duration (until 17 hours) for a concentration of parent compound in the linear range (below the expected K_m). We then chose to analyze both datasets together in order to come up with only one estimated value for the metabolic parameters (V_{max} , K_m and the ratio V_{max}/K_m) that describe both experiments.

The metabolic parameters were estimated in a Bayesian framework using Markov chains Monte Carlo simulations. The MCSim software was used. Non informative prior distributions (uniform law) were used for all parameters. Initial concentrations of permethrin in the incubation medium were estimated to account for the analytical measurement errors. They were assumed to be distributed log-normally with mean the measured concentration and a standard deviation corresponding to 20% of error.

III. QUANTIFICATION IN VITRO DU METABOLISME HEPATIQUE DE LA PERMETHRINE ET DES SES METABOLITES CHEZ L'HOMME

Tableau 29. The non specific adsorption (%) of *cis*- and *trans*-permethrin on polypropylene tubes and on wells containing cells (n = 3)

	<i>cis</i> -permethrin		<i>trans</i> -permethrin	
	5 μ M	125 μ M	5 μ M	125 μ M
Polypropylene tubes	30 \pm 1	16 \pm 1	32 \pm 2	27 \pm 2
Wells with cells	8.2 \pm 2.1	4.2 \pm 0.4	12.9 \pm 3.4	4.9 \pm 0.1

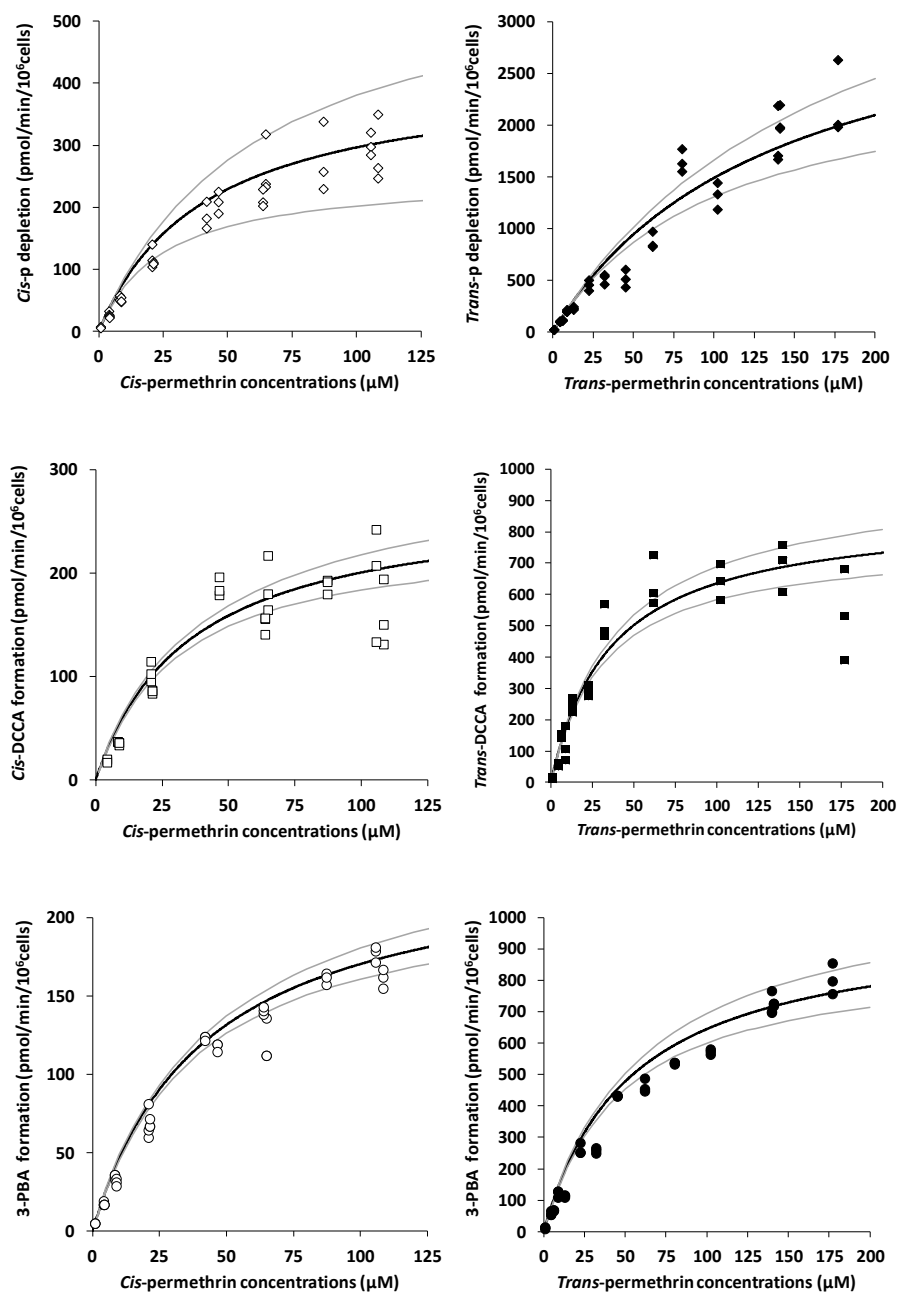


Figure 40. Saturation kinetic profiles of the depletion of permethrin (\diamond) and the formation of 3-PBA (\circ) and DCCA (\square) in human primary hepatocytes. Open and closed figures are respectively related to the *cis* and *trans* isomers. Black solid line (—) and grey solid lines (—) stand respectively for the average, the 5th and 95th percentiles value of the estimated rates.

Results

Non-specific binding

Table 29 summarizes the results of the non-specific binding of permethrin on the experimental devices. The adsorption of *cis*- and *trans*-permethrin on the polypropylene tubes was about 30% after 10 min of exposure at two concentrations (5 μM and 125 μM). Similar results were obtained on Pyrex tubes. The adsorption on the tubes was followed for 2 hours and slightly increased in time. According to these results, the permethrin solutions prepared in the tubes were used within 30 min of preparation. An aliquot was taken at the beginning of the experiments to determine the initial concentration in the medium.

The non-specific binding of *cis*- and *trans*-permethrin on the well walls and the cell membranes after 3 hours of exposure was dependent of the tested concentrations and was assessed to about 10% and 5% for the low and high concentrations respectively. The binding increased slightly in time from $2.99 \pm 0.03\%$ after 30 min to $5.62 \pm 0.96\%$ after 4 h for 125 μM of *trans*-permethrin. Results of the test control performed at 37°C without cells in well were also very low. Because these values are in the range of the analytical measurement error, no correction was applied.

Specific activity of CYPs and esterases

The CYP3A4 activity was estimated at 12.6 ± 1.4 pmol/min/ 10^6 cells (69 \pm 3% of midazolam was remaining after 6 hours) and the CYP2C19 activity at 0.050 ± 0.002 pmol/min/ 10^6 cells. As already observed in human hepatocytes (Yuan et al. 2002), the CYP3A4 activity predominates on the CYP2C19 activity by a factor of 250 for our pool. The estimated activities are in the range of the CYPs activities measured by Li et al. (1999) in cryopreserved human hepatocytes from 17 donors. They reported a CYP3A4 activity ranging from 3.3 to 190 pmol/min/ 10^6 cells tested by testosterone and a CYP2C19 activity from no activity to 40 pmol/min/ 10^6 cells tested by (S)-mephenytoin. Our results are in the low range of their observations. The esterase activity was estimated at 233 ± 15 nmol/min/ 10^6 cells. No data for comparison was found in the literature. These results confirm that the esterase activity is largely higher than the CYP one.

Metabolism of *cis*- and *trans*-permethrin separately and formation of metabolites

Figure 40 presents the depletion rates of the parent compounds and the formation rates of the metabolites when *cis*- and *trans*-permethrin are incubated separately. The kinetics of the isomers incubated separately at a low concentration are represented in Figure 41. From the observed rates and kinetics, the Michaelis-Menten parameters were estimated and are summarized in Table 30.

The apparent Michaelis-Menten parameters for the depletion of *cis*-permethrin were estimated to the values of 420 ± 147 pmol/min/ 10^6 cells for the maximum velocity (V_{max}), 42 ± 15 μM for the Michaelis affinity constant (K_m) and 10.1 ± 0.3 $\mu\text{L}/\text{min}/10^6$ cells for the intrinsic clearance. The determination of the kinetic parameters was limited for *trans*-permethrin as the saturation was not reached at the highest concentration (measured concentration at 180 μM). Because of solubility and cell viability issues, the experiments at higher concentrations were not feasible.

III. QUANTIFICATION IN VITRO DU METABOLISME HEPATIQUE DE LA PERMETHRINE ET DES SES METABOLITES CHEZ L'HOMME

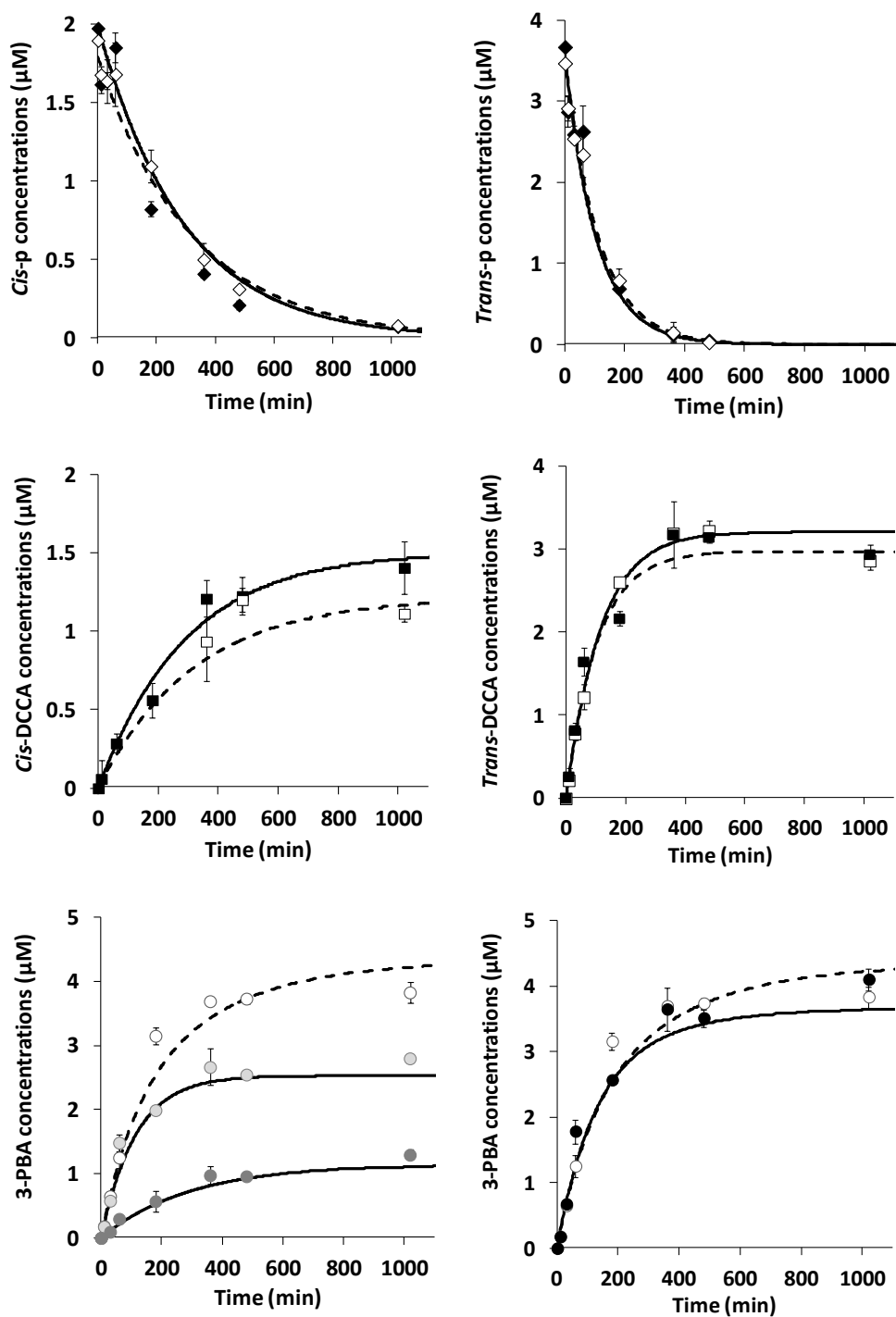


Figure 41. Kinetics of *cis*- and *trans*-permethrin (\diamond) and its metabolites *cis*- and *trans*-DCCA (\square) and 3-PBA (\circ) for an incubation of *cis*-permethrin and *trans*-permethrin at 2 μM and 3 μM respectively. Closed signs/solid lines and open signs/dotted lines are related to the conditions of incubation alone and in mixture, respectively. Concentrations of 3-PBA formed from *cis*-permethrin (\bullet), *trans*-permethrin (\bullet) and from the both isomers (\bullet) are also represented.

In that context, the determination of V_{\max} and K_m parameters can be tricky since these parameters are highly correlated. We therefore used an informative prior distribution for the maximal velocity (a lognormal distribution) and obtained that the estimated V_{\max} was $3,543 \pm 571$ pmol/min/ 10^6 cells and the estimated K_m was 138 ± 23 μ M for the depletion of *trans*-permethrin. These values lead to an estimated *in vitro* intrinsic clearance value of 25.7 ± 0.6 μ L/min/ 10^6 cells for *trans*-permethrin (Table 31). For both isomers, the estimated curves fit the data well for all experiments (Figure 40 and Figure 41). The estimated 95% confidence intervals for the depletion rates are relatively tight around the mean for all compounds except for *cis*-permethrin. As already observed in previous *in vitro* and *in vivo* experiments, *trans*-permethrin is cleared more rapidly than *cis*-permethrin. *Trans*-permethrin has a value of V_{\max} about 10 times higher and a lower affinity for the enzymes of metabolism compared to *cis*-permethrin. A 2.6-factor was observed between the ratio V_{\max}/K_m in our experiments that is far from the one observed (12-factor) in human microsomes (Scollon et al. 2009).

The formation rates of *cis*-DCCA, *trans*-DCCA and 3-PBA are reproduced in Figure 40 and reported in Table 30. The saturation of the reactions was reached for all metabolites. The estimated values of Michaelis-Menten parameters related to the metabolites of *cis*-permethrin (*cis*-DCCA and 3-PBA) were of the same order, as the ones for the *trans*-permethrin metabolites (*trans*-DCCA and 3-PBA). All the K_m values are within the same range (between 36 to 52 μ M). The formation rate of *trans*-DCCA was three times higher than the one of *cis*-DCCA. Following the incubation of *cis*-permethrin, the values of the *in vitro* rate of formation were estimated at 7.6 ± 0.4 μ L/min/ 10^6 cells for *cis*-DCCA and 5.8 ± 0.2 μ L/min/ 10^6 cells for 3-PBA. The incubation of *trans*-permethrin leads to the formation of *trans*-DCCA at a rate of 23.9 ± 1.0 μ L/min/ 10^6 cells and of 3-PBA at 18.5 ± 0.8 μ L/min/ 10^6 cells. A 3-factor was then observed between the respective rates of formation of DCCA and 3-PBA obtained from *trans*- and *cis*-permethrin. For both isomers, the rate of formation of DCCA was higher than the one of 3-PBA. These observations are in agreement with the fact that DCCA is a direct metabolite compared to 3-PBA that is formed after several steps and that the carboxylesterase activity (mostly responsible of the DCCA formation) is rapid compared to the aldehyde deshydrogenase (ALDH) and alcohol deshydrogenase (ADH) activities. The representative time course of the metabolites show that the formation of metabolites is quite rapid with a steady state reached after 6 hours of incubation (Figure 41). The predicted concentrations in each metabolite correctly reproduce the observed kinetic profiles.

Effect of the co-incubation of isomers on metabolism

The effect of the co-incubation of both isomers on their metabolism was tested at several concentrations to determine their inhibitory potential (Figure 42). A unique concentration of *cis*- or *trans*-permethrin (5 μ M) was incubated with different concentrations of *cis*- or *trans*-permethrin, respectively. We observed that the metabolic rates were very slightly impacted by the presence of the two isomers (less than 15% until 20 μ M). For instance, at the ratio 50:50, the metabolism of *cis*-permethrin is inhibited by $12 \pm 3\%$ and by $6 \pm 4\%$ for *trans*-permethrin which is cannot be considered as significant regarding the experimental uncertainties. The maximum of inhibition reached was about 50%, obtained for concentrations of inhibitor more than 10 times higher than for the substrate. The concentrations of the inhibitors were not increased due to solubility issues. According to our results, *cis*- and *trans*-permethrin have both a low inhibitory potential on each other.

III. QUANTIFICATION IN VITRO DU METABOLISME HEPATIQUE DE LA PERMETHRINE ET DES SES METABOLITES CHEZ L'HOMME

Tableau 30. Estimated values (average \pm standard deviation) of the kinetic constants V_{max} and K_m and the ratio V_{max}/K_m of the depletion of *cis*-permethrin and *trans*-permethrin and the formation of 3-PBA, *cis*-DCCA and *trans*-DCCA in human primary hepatocytes

	V_{max} (pmol/min/ 10^6 cell)	K_m (μ M)	V_{max}/K_m (μ L/min/ 10^6 cells)	V_{max}/K_m (mL/min/kg)
<i>Cis</i> -permethrin	420 \pm 147	42 \pm 15	10.1 \pm 0.3	26.0 \pm 0.8
<i>Trans</i> -permethrin	3,543 \pm 571	138 \pm 23	25.7 \pm 0.6	66.1 \pm 1.6
<i>Cis</i> -DCCA	272 \pm 21	36 \pm 4	7.6 \pm 0.4	19.7 \pm 0.9
<i>Trans</i> -DCCA	866 \pm 36	36 \pm 4	23.9 \pm 1.0	61.4 \pm 2.7
3-PBA from <i>cis</i> -permethrin	242 \pm 14	42 \pm 4	5.8 \pm 0.2	14.9 \pm 0.5
3-PBA from <i>trans</i> -permethrin	989 \pm 72	53 \pm 5	18.5 \pm 0.8	47.7 \pm 2.0

Tableau 31. Intrinsic clearances (average \pm standard deviation) of depletion of *cis*-permethrin and *trans*-permethrin and the rate of formation of its metabolites 3-PBA, *cis*-DCCA and *trans*-DCCA, alone and as a mixture of 2 μ M of *cis*-permethrin and 3 μ M of *trans*-permethrin in human primary hepatocytes

	Rate (μ L/min/ 10^6 cells)			Rate (mL/min/kg)		
	<i>Cis</i> -p alone	<i>Trans</i> -p alone	Mixture <i>cis/trans</i> -p	<i>Cis</i> -p alone	<i>Trans</i> -p alone	Mixture <i>cis/trans</i> -p
<i>Cis</i> -p	10.1 \pm 0.3	-	9.1 \pm 0.3	26.0 \pm 0.8	-	23.3 \pm 0.8
<i>Trans</i> -p	-	25.7 \pm 0.6	27.8 \pm 0.6	-	66.1 \pm 1.6	71.6 \pm 1.6
<i>Cis</i> -DCCA	7.6 \pm 0.4	-	6.1 \pm 0.4	19.7 \pm 0.9	-	15.8 \pm 1.0
<i>Trans</i> -DCCA	-	23.9 \pm 1.0	23.0 \pm 1.3	-	61.4 \pm 2.7	59.1 \pm 3.4
3-PBA	5.8 \pm 0.2	18.5 \pm 0.8	13.2 \pm 0.7	14.9 \pm 0.5	47.7 \pm 2.0	34.1 \pm 1.7

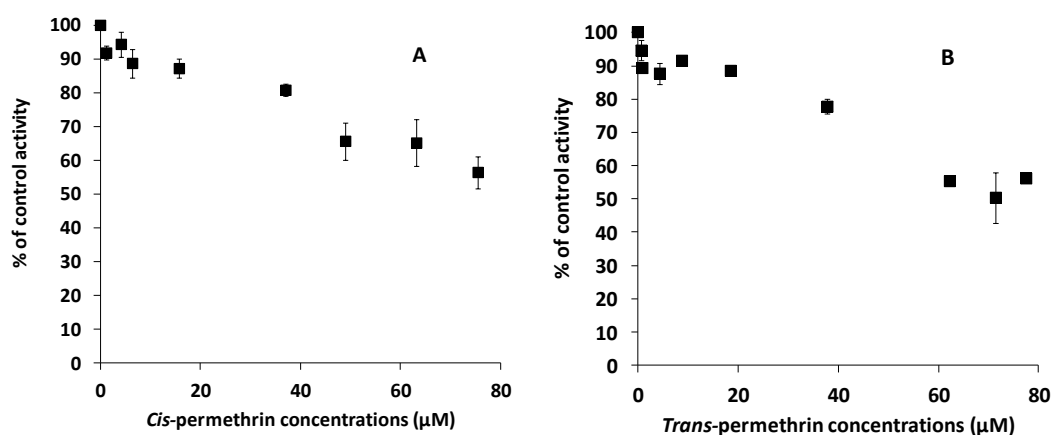


Figure 42. Effect on metabolism of *trans*-permethrin (respectively *cis*-permethrin) (5 μ M) incubated with different concentrations of *cis*-permethrin (respectively *trans*-permethrin) at respectively 3 h (A) and 4 h (B)

To confirm these results, the kinetics of *cis*- and *trans*-permethrin incubated together were studied with the formation of the metabolites. An isomer ratio 40:60 usually found in commercial products was used. No difference was observed on the kinetics of the parent compounds and the metabolites compared to the incubations of the separate isomers (Figure 41). The estimated intrinsic clearances are then similar in both incubation conditions. The total amount of 3-PBA formed in the co-incubation experiment is equal to the sum of the amount recovered after the incubation of isomers separately (Figure 41). According to our results, an interaction between the two isomers is therefore unlikely.

Discussion

The aim of this study was to determine simultaneously the metabolic rates of depletion of *cis*- and *trans*-permethrin and the formation rates of the metabolites *cis*- and *trans*-DCCA and 3-PBA in human hepatocytes under adequate conditions for *in vitro*-*in vivo* extrapolation. The quality of the *in vitro*-*in vivo* extrapolation of metabolic clearances depends on many factors such as the experimental conditions and design, the type of data collected and the statistical analysis (Lipscomb and Poet 2008). One of the main features relating to the experimental conditions is to characterize the *in vitro* system in order to assess the actual concentration of the compounds that will be available for metabolism. Several sources of loss or non-specific binding were identified in our system: loss during the preparation of the sample solutions, binding to the well walls or to the cell membranes, and binding to the constituents of the culture medium. The concentration of permethrin was therefore measured at the beginning of each experiment and used in the data analysis instead of the nominal concentration. Significant deviations were observed between the nominal and actual concentrations (about 30% for both isomers) highlighting the need of such measurements to derive reliable estimates for the metabolic rates. On the contrary the binding to the well walls and to the cell membranes was found negligible for permethrin. Since the metabolites DCCA and 3-PBA are hydrophilic compounds, their non-specific binding to the plastic devices was assumed lower than for permethrin and then was not evaluated. This low binding is probably explained by a higher binding of permethrin, a lipophilic compound ($\log K_{ow} = 6.5$), to the proteins in serum than to plastic devices (Kramer et al. 2012). The binding to the medium constituents was not quantified but was handled by adding serum to the incubation medium in order to reproduce the *in vivo* plasmatic binding at the *in vitro* scale (Li 2007). The quantification of the unbound fraction in the culture medium maybe valuable to correct the *in vitro* clearances before the extrapolation to *in vivo* clearances under other experimental conditions. However even if this correction has been raised in several papers (Obach 1999; Riley et al. 2005), it has not been proven to be effective for all the compounds (Brown et al. 2007b; De Buck et al. 2007; Kramer et al. 2012; Sohlenius-Sternbeck et al. 2010).

Special attention was put on the data analysis to come up with only one estimated value for the clearances or formation rates that fits with the permethrin and metabolites kinetics obtained under different experimental conditions. Our results show that this estimated value was able to describe all the experiments and then that our experiments were consistent. The intrinsic clearances estimated in this study on hepatocytes were lower than those previously determined on human microsomes, i.e. 26.0 ± 0.8 mL/min/kg vs 52 ± 12 mL/min/kg for *cis*-permethrin and 66.1 ± 1.6 mL/min/kg vs 636 ± 53 mL/min/kg for *trans*-permethrin (Scollon et al. 2009). The differences between the

estimates obtained in the two cellular materials are not uncommon and were already observed for other compounds (Brown et al. 2007a; Hallifax et al. 2005; Lu et al. 2006). The hydrolytic and oxidative pathways mainly responsible of permethrin metabolism are both activated in microsomes and hepatocytes but levels and activities of the metabolizing enzymes differ. On one hand, the higher clearance rates in microsomes can be explained by lower CYPs activities in hepatocytes than in microsomes and by the effect of the cellular uptake of compounds in hepatocytes (Lu et al. 2006). On the other hand, the level of carboxylesterases should be higher in hepatocytes since these enzymes are also present in the cytosol. As it may be difficult to compare and interpret the metabolic rates derived from various experiments even in the same cellular material, the activities of the main CYPs involved in permethrin and pyrethroid metabolism (CYP3A4 and CYP2C19) and of the carboxylesterases were quantified using specific substrates. The CYPs activities of our hepatocytes lots were in the low range of activities reported by Li et al. (1999). Such information is valuable to derive probabilistic distributions for the metabolic rates in order to reflect the variability of the population. This was not proposed here since the contribution of the different CYPs to the metabolic rates is not quantified that limits the derivation of reliable variability factors.

To our knowledge, this study is the first to determine rates of formation of the metabolites that are used as biomarkers of exposure to permethrin in biomonitoring studies. The similarity between the values of V_{max} of metabolites and the parent compound for the *cis* isomer respects the molarity of the metabolic reaction of permethrin. The same observation does not hold for *trans*-permethrin for which a 3-factor was estimated between the maximal velocities of the parent compound and the metabolites. However the intrinsic clearances of permethrin and the metabolites formation rates are of the same order for both isomers (the rates for 3-BPA are always a bit lower) and the intrinsic clearance of the *cis*-isomer represents only 39% of the *trans*-isomer clearance. The higher estimated formation rate of DCCA than for 3-PBA for both isomers supports that ALDH and ADH have a slower activity than carboxylesterases and that DCCA is a direct metabolite of permethrin.

The characterization of a potential interaction of *cis*- and *trans*-permethrin incubated together (ratio 40:60) produced also different results on hepatocytes (this study) and on microsomes (Scollon et al. 2009). Indeed the effect of the co-incubation on the clearance observed in microsomes (a reduction by 64% for *trans*-permethrin) was not observed in hepatocytes at a low concentration below the individual K_m . To support the absence of interaction between both isomers in hepatocytes, additional experiments were performed and several concentrations of *cis*- or *trans*-permethrin were incubated with a fixed concentration of the other isomer. A significant impact on metabolism (> 20%) was observed when the suspected inhibitor is in excess compared to the substrate (substrate at 5 μ M and inhibitor at 40 μ M). A reduction of the clearance by 50% is only observed for a mixture ratio of about 6:94. Even if these experiments show an impact on metabolism for high concentrations of permethrin and an excess of one isomer compared to the other, our results indicate that a metabolic interaction between the permethrin isomers is unlikely under normal exposures. The impact of the co-incubation on the *trans*-permethrin clearance in human microsomes was also observed in rat microsomes (Scollon et al. 2009). In that species, several experiments were performed and indicated that the reduced intrinsic clearance for *trans*-permethrin was mainly due to a low mean value of K_m for *trans*-permethrin in co-incubation. However the estimated ranges of the K_m values overlap in the two conditions of incubation. These results tend to support that the variability may be responsible of the observed reduced clearance of *trans*-permethrin in co-incubation.

In conclusion, our results allow quantifying the human metabolism of *cis*- and *trans*-permethrin, insecticides widely used, and their metabolites *cis*- and *trans*-DCCA and 3-PBA. Evaluation of the metabolism of the mixture *cis/trans*-permethrin, under realistic conditions, did not show any interaction. This quantitative information can be used to parameterize a human physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model for permethrin to predict the internal exposure in target organs or to interpret the concentrations of biomarkers of exposures measured in biomonitoring studies.

Footnotes

This work was supported by the foundation of the University of Technology in Compiègne “La Fondation UTC pour l’Innovation” (Project ToxOnChip) and the French Ministry of Ecology and Sustainable Development.

References

- Barr DB, Olsson AO, Wong LY, Udunka S, Baker SE, Whitehead RD, Magsumbol MS, Williams BL, and Needham LL (2010) Urinary concentrations of metabolites of pyrethroid insecticides in the general U.S. population: National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2002. *Environ Health Persp* **118**:742-748.
- Barter ZE, Bayliss MK, Beaune PH, Boobis AR, Carlile DJ, Edwards RJ, Houston JB, Lake BG, Lipscomb JC, Pelkonen OR, Tucker GT, and Rostami-Hodjegan A (2007) Scaling factors for the extrapolation of in vivo metabolic drug clearance from in vitro data: Reaching a consensus on values of human microsomal protein and hepatocellularity per gram of liver. *Curr Drug Metab* **8**:33-45.
- Blanchard N, Richert L, Notter B, Delobel F, David P, Coassolo P, and Lave T (2004) Impact of serum on clearance predictions obtained from suspensions and primary cultures of rat hepatocytes. *Eur J Pharm Sci* **23**:189-199.
- Bradberry SM, Cage SA, Proudfoot AT, and Vale JA (2005) Poisoning due to pyrethroids. *Toxicological rev* **24**:93-106.
- Brown HS, Chadwick A, and Houston JB (2007a) Use of isolated hepatocyte preparations for cytochrome p450 inhibition studies: comparison with Microsomes for Ki determination. *Drug Metab Dispo* **35**:2119-2126.
- Brown HS, Griffin M, and Houston JB (2007b) Evaluation of cryopreserved human hepatocytes as an alternative in vitro system to microsomes for the prediction of metabolic clearance. *Drug Metab Dispo* **35**:293-301.
- Chanda SM, Mortensen SR, Moser VC, and Padilla S (1997) Tissue-specific effects of chlorpyrifos on carboxylesterase and cholinesterase activity in adult rats: An in vitro and in vivo comparison. *Fund Appl Toxicol* **38**:148-157.
- Choi J, Rose RL, and Hodgson E (2002) In vitro human metabolism of permethrin: the role of human alcohol and aldehyde dehydrogenases. *Pestic Biochem Phys* **74**:117-128.
- Crow JA, Borazjani A, Potter PM, and Ross MK (2007) Hydrolysis of pyrethroids by human and rat tissues: Examination of intestinal, liver and serum carboxylesterases. *Toxicol Appl Pharm* **221**:1-12.
- Davies B and Morris T (1993) Physiological-Parameters in Laboratory-Animals and Humans. *Pharm Res* **10**:1093-1095.
- De Buck SS, Sinha VK, Fenu LA, Nijssen MJ, Mackie CE, and Gilissen RAHJ (2007) Prediction of Human Pharmacokinetics Using Physiologically Based Modeling: A Retrospective Analysis of 26 Clinically Tested Drugs. *Drug Metab Dispo* **35**:1766-1780.
- de Sousa G, Fontaine F, Pralavorio M, Botta-Fridlund D, Letreut Y, and Rahmani R (1997) Insecticide cytotoxicity and CYP1A1/2 induction in primary human and rat hepatocyte cultures. *Toxicol in Vitro* **11**:451-457.
- Gaughan LC, Unai T, and Casida JE (1977) Permethrin Metabolism in Rats. *J Agric Food Chem* **25**:9-17.
- Groothuis FA, Heringa MB, Nicol B, Hermens JLM, Blaauboer BJ, and Kramer NI (2013) Dose metric considerations in in vitro assays to improve quantitative in vitro-in vivo dose extrapolations. *Toxicology*.
- Hallifax D, Rawden HC, Hakooz N, and Houston JB (2005) Prediction of metabolic clearance using cryopreserved human hepatocytes: Kinetic characteristics for five benzodiazepines. *Drug Metab Dispo* **33**:1852-1858.
- Hewitt NJ, Lechon MJ, Houston JB, Hallifax D, Brown HS, Maurel P, Kenna JG, Gustavsson L, Lohmann C, Skonberg C, Guillouzo A, Tuschl G, Li AP, LeCluyse E, Groothuis GMM, and Hengstler JG (2007) Primary Hepatocytes: Current Understanding of the Regulation of Metabolic Enzymes and Transporter Proteins, and Pharmaceutical Practice for the Use of Hepatocytes in Metabolism, Enzyme Induction, Transporter, Clearance, and Hepatotoxicity Studies. *Drug Metab Rev* **39**:159-234.

- Imai K, Yoshinaga J, Yoshikane M, Shiraishi H, Mieno MN, Yoshiike M, Nozawa S, and Iwamoto T (2014) Pyrethroid insecticide exposure and semen quality of young Japanese men. *Reprod Toxicol* **43**:38-44.
- Kramer NI, Krismartina M, Rico-Rico A, Blaauboer BJ, and Hermens JLM (2012) Quantifying Processes Determining the Free Concentration of Phenanthrene in Basal Cytotoxicity Assays. *Chem Res Toxicol* **25**:436-445.
- Lavado R, Li J, Rimoldi JM, and Schlenk D (2014) Evaluation of the stereoselective biotransformation of permethrin in human liver microsomes: Contributions of cytochrome P450 monooxygenases to the formation of estrogenic metabolites. *Toxicol Lett* **226**:192-197.
- Lave T, Coassolo P, and Reigner B (1999) Prediction of hepatic metabolic clearance based on interspecies allometric scaling techniques and in vitro in vivo correlations. *Clin Pharmacokinet* **36**:211-231.
- Lestremau F, Willemin ME, Chatellier C, Desmots S, and Brochot C (2014) Determination of cis-permethrin, trans-permethrin and associated metabolites in rat blood and organs by gas chromatography-ion trap mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **406**:3477-3487.
- Li AP (2007) Human hepatocytes: Isolation, cryopreservation and applications in drug development. *Chem Biol Interact* **168**:16-29.
- Li AP, Lu C, Brent JA, Pham C, Fackett A, Ruegg CE, and Silber PM (1999) Cryopreserved human hepatocytes: characterization of drug-metabolizing activities and applications in higher throughput screening assays for hepatotoxicity, metabolic stability, and drug-drug interaction potential. *Chem Biol Interact* **121**:17-35.
- Lipscomb JC and Poet TS (2008) In vitro measurements of metabolism for application in pharmacokinetic modeling. *Pharmacol Therapeut* **118**:82-103.
- Lu C, Li P, Gallegos R, Uttamsingh V, Xia CQ, Miwa GT, Balani SK, and Gan L-S (2006) Comparison of Intrinsic Clearance in Liver Microsomes and Hepatocytes from Rats and Humans: Evaluation of Free Fraction and Uptake in Hepatocytes. *Drug Metab Dispo* **34**:1600-1605.
- McGinnity DF, Soars MG, Urbanowicz RA, and Riley RJ (2004) Evaluation of fresh and cryopreserved hepatocytes as in vitro drug metabolism tools for the prediction of metabolic clearance. *Drug Metab Dispo* **32**:1247-1253.
- McMullin TS, Hanneman WH, Cranmer BK, Tessari JD, and Andersen ME (2007) Oral absorption and oxidative metabolism of atrazine in rats evaluated by physiological modeling approaches. *Toxicology* **240**:1-14.
- Meeker JD, Barr DB, and Hauser R (2008) Human semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary metabolites of pyrethroid insecticides. *Hum Reprod* **23**:1932-1940.
- Mikata K, Isobe N, and Kaneko H (2012) Biotransformation and enzymatic reactions of synthetic pyrethroids in mammals. *Top curr chem* **314**:113-135.
- Nishi K, Huang H, Kamita SG, Kim I-H, Morisseau C, and Hammock BD (2006) Characterization of pyrethroid hydrolysis by the human liver carboxylesterases hCE-1 and hCE-2. *Arch Biochem Biophys* **445**:115-123.
- Obach RS (1999) Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic clearance data: An examination of in vitro half-life approach and nonspecific binding to microsomes. *Drug Metab Dispo* **27**:1350-1359.
- Ouattara DA, Choi S-H, Sakai Y, Pery ARR, and Brochot C (2011) Kinetic modelling of in vitro cell-based assays to characterize non-specific bindings and ADME processes in a static and a perfused fluidic system. *Toxicol Lett* **205**:310-319.
- Pelkonen O and Turpeinen M (2007) In vitro-in vivo extrapolation of hepatic clearance: Biological tools, scaling factors, model assumptions and correct concentrations. *Xenobiotica* **37**:1066-1089.
- Riley RJ, McGinnity DF, and Austin RP (2005) A unified model for predicting human hepatic, metabolic clearance from in vitro intrinsic clearance data in hepatocytes and microsomes. *Drug Metab Dispo* **33**:1304-1311.

III. QUANTIFICATION IN VITRO DU METABOLISME HEPATIQUE DE LA PERMETHRINE ET DES SES METABOLITES CHEZ L'HOMME

- Ross MK, Borazjani A, Edwards CC, and Potter PM (2006) Hydrolytic metabolism of pyrethroids by human and other mammalian carboxylesterases. *Biochem Pharmacol* **71**:657-669.
- Rostami-Hodjegan A and Tucker GT (2007) Simulation and prediction of in vivo drug metabolism in human populations from in vitro data. *Nat Rev Drug Discov* **6**:140-148.
- Scollon EJ, Starr JM, Godin SJ, DeVito MJ, and Hughes MF (2009) In Vitro Metabolism of Pyrethroid Pesticides by Rat and Human Hepatic Microsomes and Cytochrome P450 Isoforms. *Drug Metab Dispo* **37**:221-228.
- Sohlenius-Sternbeck AK, Afzelius L, Prusis P, Neelissen J, Hoogstraate J, Johansson J, Floby E, Bengtsson A, Gissberg O, Sternbeck J, and Petersson C (2010) Evaluation of the human prediction of clearance from hepatocyte and microsome intrinsic clearance for 52 drug compounds. *Xenobiotica* **40**:637-649.
- Stout DM, II, Bradham KD, Egeghy PP, Jones PA, Croghan CW, Ashley PA, Pinzer E, Friedman W, Brinkman MC, Nishioka MG, and Cox DC (2009) American Healthy Homes Survey: A National Study of Residential Pesticides Measured from Floor Wipes. *Environ Sci Technol* **43**:4294-4300.
- Takaku T, Mikata K, Matsui M, Nishioka K, Isobe N, and Kaneko H (2011) In Vitro Metabolism of trans-Permethrin and Its Major Metabolites, PBalc and PBacid, in Humans. *J Agric Food Chem* **59**:5001-5005.
- Tornero-Velez R, Davis J, Scollon EJ, Starr JM, Setzer RW, Goldsmith M-R, Chang DT, Xue J, Zartarian V, De Vito MJ, and Hughes MF (2012) A pharmacokinetic model of cis- and trans-permethrin disposition in rats and humans with aggregate exposure application. *Toxicol Sci* **130**:33-47.
- Ueyama J, Saito I, and Kamijima M (2010) Analysis and evaluation of pyrethroid exposure in human population based on biological monitoring of urinary pyrethroid metabolites. *J Pestic Sci* **35**:87-98.
- US EPA (2011) Pesticides Industry Sales and Usage: 2006 and 2007 Market Estimates, U.S. Environmental Protection Agency, Washington.
- Yang D, Pearce RE, Wang X, Gaedigk R, Wan Y-JY, and Yan B (2009) Human carboxylesterases HCE1 and HCE2: Ontogenic expression, inter-individual variability and differential hydrolysis of oseltamivir, aspirin, deltamethrin and permethrin. *Biochem Pharmacol* **77**:238-247.
- Yoon M, Campbell JL, Andersen ME, and Clewell HJ (2012) Quantitative in vitro to in vivo extrapolation of cell-based toxicity assay results. *Crit Rev Toxicol* **42**:633-652.
- Young HA, Meeker JD, Martenies SE, Figueroa ZI, Barr DB, and Perry MJ (2013) Environmental exposure to pyrethroids and sperm sex chromosome disomy: a cross-sectional study. *Environ Health* **12**.
- Yuan R, Madani S, Wei XX, Reynolds K, and Huang SM (2002) Evaluation of cytochrome P450 probe substrates commonly used by the pharmaceutical industry to study in vitro drug interactions. *Drug Metab Dispo* **30**:1311-1319.

Discussion générale & Perspectives

DISCUSSION GENERALE & PERSPECTIVES

La quantification de l'exposition à la perméthrine dans les tissus cibles chez l'homme est une des étapes clef dans l'évaluation du risque lié aux pyréthriinoïdes. Les métabolites servant de biomarqueurs d'exposition, la caractérisation de la relation entre les parents et les métabolites est une étape essentielle pour la détermination de la dose interne d'exposition. Au cours de cette thèse, la relation entre les composés parents et les métabolites a été établie chez deux espèces (rat et homme) par deux approches (*in vivo* et *in vitro*). La première étape a consisté à construire un modèle PBPK de la perméthrine et de ses métabolites chez le rat. Les expériences de cinétique chez le rat ont permis de calibrer le modèle PBPK pour estimer dans un contexte bayésien les paramètres toxicocinétiques de la perméthrine et de ses métabolites. La seconde étape a été la détermination du métabolisme hépatique *in vivo* chez l'homme de chacun des composés à partir de supports *in vitro*. Les expériences *in vitro* ont été réalisées sur des hépatocytes primaires humains dans des conditions adéquates pour l'extrapolation *in vitro-in vivo* des données. La détermination de la cinétique de la perméthrine et de ses métabolites étant basée sur la quantification des composés dans différentes matrices, la première étape a été de développer une méthode analytique pour répondre aux attentes de l'étude.

Cohérence des données obtenues et leur apport sur la connaissance des pyréthriinoïdes

La performance de la méthode analytique a pu être évaluée au cours des expériences menées pendant la thèse. Cette méthode permet de quantifier dans un seul échantillon des composés aux propriétés physico-chimiques différentes (parent-métabolite) et aux configurations chimiques proches (isomères). Cette méthode a pu être utilisée sur les échantillons provenant des expériences aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. Au vue de la diversité des matrices étudiées, l'utilisation d'un étalon interne pour chacun des composés a été un atout pour s'assurer de l'exactitude des concentrations. Les critères de qualité d'une méthode analytique développée ont pu être validés positivement. En particulier les valeurs des LOQ n'ont jamais été limitantes pour la quantification des composés. La reproductibilité et la robustesse de la méthode ont pu être évaluées par l'utilisation de la méthode dans deux laboratoires et sur deux appareillages différents. La qualité d'une méthode analytique à annoncer de manière précise les concentrations est essentielle au développement des modèles toxicocinétiques.

Une certaine cohérence sur la cinétique de la perméthrine et de ses métabolites ressort des expériences *in vivo* et *in vitro*. Le temps de résidence plus important de l'isomère *cis* de la perméthrine par rapport à l'isomère *trans* est retrouvé dans l'ensemble des matrices étudiées. Cette observation se retrouve chez les deux espèces au niveau du métabolisme hépatique. Un facteur trois est présent entre les clairances hépatiques chez le rat des formes *cis* et *trans* (Résultats - II). Cette même différence a été retrouvée pour les clairances intrinsèques *in vivo* chez l'homme, extrapolées à partir des résultats *in vitro* (Résultats - III). Les expériences *in vivo* réalisées lors du développement de

la méthode analytique (Résultats - I) et celles servant à la calibration du modèle PBPK chez le rat (Résultats - II) présentent aussi des résultats cohérents. Les concentrations en *cis*-perméthrine étaient supérieures à celles en *trans*-perméthrine dans les tissus comme dans les fluides. L'accumulation de perméthrine dans les graisses a été retrouvée lors de ces deux études cinétiques. Une absence d'accumulation de la perméthrine dans les muscles a été observée. La caractérisation de l'exposition tissulaire chez le rat a montré que les testicules et le cerveau, organes cibles des pyréthriinoïdes, étaient exposés à l'isomère le plus persistant de la perméthrine (*cis*). Associés à la toxicité reconnue de la forme *cis*, ces résultats expliquent l'intérêt porté à la caractérisation de son exposition. Le profil cinétique des isomères de la perméthrine obtenu lors de ces expériences est aussi en accord (hormis pour les muscles) avec les données déjà présentes dans la littérature sur la perméthrine et sur les pyréthriinoïdes en général (Mirfazaelian *et al.* 2006; Scollon *et al.* 2009; Tornero-Velez *et al.* 2012).

Ce travail de thèse a surtout permis d'accroître la connaissance sur la cinétique des biomarqueurs d'exposition dosés lors des campagnes de biosurveillance (*cis*-DCCA, *trans*-DCCA et 3-PBA). Une cohérence existe entre les vitesses de formation des métabolites selon l'isomérisation du composé parent. La différence de vitesse de métabolisation des composés parents s'exprime aussi dans la vitesse de formation des métabolites 3-PBA et DCCA. Un facteur trois a aussi été observé entre les vitesses de formation des métabolites des isomères *cis* et *trans* au niveau *in vitro* et *in vivo*. La répartition de la quantité de ces métabolites formés a pu être établie. Chez le rat, le ratio entre la vitesse de formation du DCCA et celle du 3-PBA est très élevé. La vitesse de formation du DCCA équivaut une faible fraction de la clairance du composé parent (Résultats - II). En revanche, chez l'homme, la vitesse de formation du DCCA est légèrement plus faible que celle du 3-PBA. La vitesse de formation du DCCA est similaire à celle de disparition du composé parent (Résultats - III). Cette différence peut provenir d'une variabilité inter-espèce ou de la nature des supports d'étude utilisés. D'une part les processus ADME agissent conjointement (rat), d'autre part seul le métabolisme est représenté, au sein d'un système isolé (hépatocytes). La confrontation des résultats obtenus pour le 3-PBA souligne un point intéressant de cinétique. Pour une dose d'exposition similaire, la quantité retrouvée en 3-PBA est importante dans le sang et le foie (Résultats - I) mais très faible dans les urines (Résultats - II). Une accumulation du 3-PBA dans les tissus peut être envisagée. La description de la cinétique du métabolite 4'-OH-PBA chez le rat a permis de souligner que ce métabolite était le plus retrouvé dans les urines, par rapport au DCCA et 3-PBA. Il pourrait être donc considéré comme un biomarqueur d'exposition à la perméthrine. Néanmoins, le 4'-OH-PBA n'étant actuellement pas recherché dans les études de biosurveillance, les études *in vitro* chez l'homme ont été focalisées sur les vitesses de formation des métabolites 3-PBA et DCCA uniquement.

La calibration du modèle PBPK chez le rat a permis de reproduire correctement la cinétique de chaque isomère et de ses métabolites dans l'ensemble des matrices. Les estimations relatives à la forme la plus toxique (*cis*) étaient en accord avec les données observées. Une surprédiction de l'accumulation de la *trans*-perméthrine dans les graisses est cependant à souligner. La cinétique du 3-PBA a été modélisée par deux compartiments empiriques alors qu'elle avait été déterminée dans le sang et le foie lors de la première étude *in vivo*. L'intégration d'un compartiment urinaire dans le modèle métabolite est essentielle pour la détermination de l'exposition tissulaire en composé. La caractérisation de l'exposition tissulaire et sanguine d'un métabolite commun n'est en revanche pas directement exploitable pour la quantification de l'exposition au composé parent.

La cinétique des isomères de la perméthrine a aussi été évaluée dans un contexte de mélange. Les résultats des études *in vivo* et *in vitro* soulignent le faible potentiel inhibiteur de ces composés entre eux. La vérification du modèle PBPK de la perméthrine a été réalisée sur des données de cinétique chez le rat exposé à un mélange 40:60 de *cis*- et *trans*-perméthrine (Tornero-Velez *et al.* 2012). Les valeurs des paramètres estimés sur les isomères séparés de la perméthrine ont permis de reproduire correctement la cinétique du mélange (Résultats - II). Le faible potentiel inhibiteur des isomères a été aussi observé au niveau *in vitro* chez l'homme. Suite à la co-incubation à une concentration très inférieure au K_m des isomères *cis* et *trans* dans un ratio environnemental, les vitesses estimées de disparition et de formation des composés étaient similaires à celles obtenues lors d'une incubation séparée (Résultats - III). L'inhibition devient significative lors de la co-incubation des isomères de la perméthrine dans un ratio 1 pour 15. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus sur un autre support cellulaire (Scollon *et al.* 2009). Une diminution de la clairance intrinsèque de la *cis*- et *trans*-perméthrine avait été observée suite à la co-incubation sur microsomes humains des isomères (ratio 40:60).

Apport des résultats dans l'évaluation du risque lié aux pyréthriinoïdes

Remis dans un contexte d'évaluation du risque lié aux pyréthriinoïdes, les résultats obtenus dans cette étude permettent de tirer certaines conclusions.

La structure retenue pour le modèle PBPK de la perméthrine est similaire à celle des modèles PBPK déjà publiés sur les pyréthriinoïdes (Godin *et al.* 2010; Mirfazaelian *et al.* 2006; Tornero-Velez *et al.* 2012). La description de la cinétique du pyréthriinoïde dans les graisses, le foie, le sang et les tissus peu et rapidement perfusés est toujours incluse. La mise en équation des processus ADME dans le corps est la même dans les différents modèles. Ces caractéristiques permettent de prédire correctement la cinétique observée pour différents pyréthriinoïdes (perméthrine, deltaméthrine). L'établissement d'un modèle PBPK générique des pyréthriinoïdes est alors envisageable. Une première utilisation de ce modèle générique serait la suivante. Ces modèles seraient couplés pour simuler une exposition à un mélange de pyréthriinoïdes. La quantification de l'exposition à un mélange et l'évaluation des risques associés est une problématique de plus en plus soulevée par les autorités sanitaires. L'apparition de certaines recommandations (US EPA 1992) et le développement de modèles de mélange (Marshall *et al.* 2013; Wason *et al.* 2013; Wason *et al.* 2012) confirment cet axe de recherche. Les caractéristiques cinétiques des pyréthriinoïdes étant désormais bien connues, de nouvelles expérimentations animales ne semblent pas nécessaires pour renseigner ces modèles. Le recours aux méthodes alternatives permettrait d'obtenir des informations suffisantes sur la cinétique des autres pyréthriinoïdes (cyperméthrine par exemple). Les valeurs des coefficients de partage et de perméabilité pourraient être estimées à l'aide de modèles QSAR. Le métabolisme des substances seules et en mélange pourrait être déterminé sur des supports *in vitro*. Dans notre étude, les hépatocytes primaires ont été utilisés pour quantifier le métabolisme. Ces cellules sont présentées classiquement comme le support idéal pour ce type d'études. Ces cellules peuvent aussi être placées dans un système dynamique tel que les biopuces à métabolisme (Baudoin *et al.* 2014). Alimentés par un flux continu, ces supports mécaniques permettent de recréer les phénomènes présents dans l'organisme (métabolisme, transport). Le couplage des hépatocytes avec des cellules intestinales est aussi possible pour recréer au mieux le métabolisme présent *in vivo* (Bricks *et al.* 2014; Prot *et al.* 2014). Dans le cas de la simulation d'une exposition à un mélange, les interactions métaboliques devront être aussi évaluées.

Un autre point important est à retenir de ces expériences. Dans ce travail de thèse, une absence d'interaction entre les deux isomères de la perméthrine à un ratio 40:60 a été observée. Ce résultat souligne que l'effet mélange ne modifie pas toujours la cinétique des composés. Si aucune interaction n'a lieu *in vitro*, le développement de modèles PBPK d'interaction ne semble pas nécessaire, en particulier pour les pyréthriinoïdes présentant plusieurs isomères. Cela pourrait par la suite simplifier les études de caractérisation de l'exposition.

Apport de la modélisation PBPK de la cinétique de la perméthrine et de ses métabolites

L'intérêt premier de la modélisation PBPK est sa capacité de relier les concentrations en métabolites urinaires aux concentrations d'exposition tissulaires en perméthrine. Le contexte paramétrique des modèles PBPK est aussi un réel atout pour l'extrapolation inter-espèce. Au cours de cette étude, un modèle PBPK des isomères de la perméthrine et de ses métabolites a été calibré chez le rat. Le métabolisme hépatique a ensuite été quantifié chez l'homme. L'étape suivante serait donc d'extrapoler le modèle PBPK rat à l'homme afin de quantifier son exposition tissulaire. Dans cette optique, plusieurs paramètres sont à prendre en compte. Le métabolisme sanguin doit être supprimé. Certains paramètres comme l'élimination urinaire doivent être renseignés par une revue de la littérature. Leurs valeurs peuvent en effet varier d'une espèce à l'autre. Le modèle PBPK une fois développé chez l'homme pourra être utilisé pour simuler différentes situations d'exposition. Les modèles PBPK vie entière permettent de simuler une exposition chronique aux composés, en intégrant les modifications physiologiques au cours des années (Beaudouin *et al.* 2010). Cette approche est intéressante pour les pyréthriinoïdes, compte tenu de leur accumulation dans les graisses. L'exposition serait alors caractérisée de manière plus réaliste et précise. Par la simulation de différents scénarios, les caractéristiques de l'exposition (rythme, dose, durée) pourront être déterminées.

Les modèles des pyréthriinoïdes déjà développés chez l'homme ont été couplés à des modèles d'exposition (SHEDS). Les résultats des études de quantification des pyréthriinoïdes dans l'environnement ont servi alors de données d'entrée aux modèles PBPK. Notre modèle présente l'avantage de décrire la cinétique des métabolites dans les urines. Par sa structure, le modèle PBPK de la perméthrine et de ses métabolites fait de la dosimétrie inverse une application directe (Tan *et al.* 2007). Les concentrations urinaires en métabolites obtenues lors des études de biosurveillance seront utilisées en tant que données d'entrée dans le modèle pour quantifier l'exposition réelle à la perméthrine au niveau tissulaire et au niveau externe. Cette approche nécessite certaines considérations. La population n'est pas exposée à un seul pyréthriinoïde, mais à un mélange de pyréthriinoïdes et l'existence de métabolites communs rend la caractérisation de l'exposition plus difficile. Le recours à un couplage de modèles PBPK de pyréthriinoïde permettra de représenter une exposition réelle à ces insecticides. La vitesse de formation des métabolites lors d'une incubation séparée et en mélange des composés parents sera à caractériser au niveau *in vitro*. Compte tenu des échantillons obtenus en biosurveillance et des populations exposées, certaines situations d'exposition seraient à étudier en priorité. A l'aide du modèle PBPK vie entière, il serait intéressant de quantifier l'exposition à la perméthrine chez les enfants, considérés comme la population la plus sensible et la plus exposée à ces insecticides. Les données urinaires récoltées chez les enfants à différents âges seront utilisées. Une autre population qu'est le fœtus pourrait être étudiée. Son exposition aux pyréthriinoïdes pendant le développement *in utero* pourra être quantifiée grâce aux données récoltées sur le méconium ou le sang de cordon ombilical. Un modèle PBPK du fœtus

comprenant en particulier le cerveau et le méconium sera couplé via le sang au niveau du placenta au modèle PBPK de la mère (Gaohua *et al.* 2012). La mise en place d'expériences complémentaires sur la ratte gestante permettra de renseigner les concentrations d'exposition dans les différentes matrices.

Le modèle PBPK développé dans ce doctorat permettra après extrapolation à l'homme de caractériser l'exposition réelle aux pyréthriinoïdes au niveau interne et externe. Pour conclure, l'obtention du modèle PBPK de la perméthrine et de ses métabolites constitue une première étape dans l'exploration et la quantification de l'exposition et des risques associés à la perméthrine.

Références

REFERENCES

- Abduljalil, K., Furness, P., Johnson, T., Rostami-Hodjegan, A., and Soltani, H. (2012). Anatomical, Physiological and Metabolic Changes with Gestational Age during Normal Pregnancy. *Clinical Pharmacokinetics* **51**, 365-396.
- AFSSET (2010). Valeurs toxicologiques de référence (VTR) - Élaboration de valeurs toxicologiques de référence - Guide méthodologique. Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement, Paris.
- Agoram, B., Woltosz, W. S., and Bolger, M. B. (2001). Predicting the impact of physiological and biochemical processes on oral drug bioavailability. *Advanced Drug Delivery Reviews* **50**, Supplement 1, S41-S67.
- Anadon, A., Martinezlarranaga, M. R., Diaz, M. J., and Bringas, P. (1991). Toxicokinetics of Permethrin in the Rat. *Toxicology and Applied Pharmacology* **110**, 1-8.
- Anand, S. S., Bruckner, J. V., Haines, W. T., Muralidhara, S., Fisher, J. W., and Padilla, S. (2006). Characterization of deltamethrin metabolism by rat plasma and liver microsomes. *Toxicology and Applied Pharmacology* **212**, 156-166.
- ANSES (2010). Exposition de la population générale aux résidus de pesticides en France. Agence nationale de sécurité sanitaire, de l'environnement et du travail.
- Anzenbacher, P., and Anzenbacherova, E. (2001). Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **58**, 737-747.
- ATSDR (2000). Toxicological profile for polychlorinated biphenyls (PCBs). Agency for Toxic Substances and Disease Registry
- U.S Department of health and human services, Georgia.
- Bailer, A. J., and Dankovic, D. A. (1997). An introduction to the use of physiologically based pharmacokinetic models in risk assessment. *Statistical methods in medical research* **6**, 341-58.
- Baker, M., and Parton, T. (2007). Kinetic determinants of hepatic clearance: Plasma protein binding and hepatic uptake. *Xenobiotica* **37**, 1110-1134.
- Baker, S. E., Olsson, A. O., and Barr, D. B. (2003). Isotope dilution high-performance liquid chromatography-tandem mass Spectrometry method for quantifying urinary metabolites of synthetic pyrethroid insecticides. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **46**, 281-288.
- Balaz, S., and Lukacova, V. (1999). A model-based dependence of the human tissue/blood partition coefficients of chemicals on lipophilicity and tissue composition. *Quantitative Structure-Activity Relationships* **18**, 361-368.
- Balimane, P. V., and Chong, S. (2005). Cell culture-based models for intestinal permeability: A critique. *Drug Discovery Today* **10**, 335-343.
- Barr, D. B., Baker, S. E., Whitehead, R. D., Wong, L., and Needham, L. L. (2010). Urinary Concentrations of Pyrethroid Metabolites in the General US Population, NHANES 1999-2002. *Epidemiology* **19**, S192-S193.
- Barter, Z. E., Bayliss, M. K., Beaune, P. H., Boobis, A. R., Carlile, D. J., Edwards, R. J., Houston, J. B., Lake, B. G., Lipscomb, J. C., Pelkonen, O. R., Tucker, G. T., and Rostami-Hodjegan, A. (2007). Scaling factors for the extrapolation of in vivo metabolic drug clearance from in vitro data: Reaching a consensus on values of human microsomal protein and hepatocellularity per gram of liver. *Current Drug Metabolism* **8**, 33-45.

- Baudoin, R., Legendre, A., Jacques, S., Cotton, J., Bois, F., and Leclerc, E. (2014). Evaluation of a Liver Microfluidic Biochip to Predict In Vivo Clearances of Seven Drugs in Rats. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **103**, 706-718.
- Beaudouin, R., Micallef, S., and Brochot, C. (2010). A stochastic whole-body physiologically based pharmacokinetic model to assess the impact of inter-individual variability on tissue dosimetry over the human lifespan. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **57**, 103-116.
- Berkowitz, G. S., Obel, J., Deych, E., Lapinski, R., Godbold, J., Liu, Z. S., Landrigan, P. J., and Wolff, M. S. (2003). Exposure to indoor pesticides during pregnancy in a multiethnic, urban cohort. *Environmental Health Perspectives* **111**, 79-84.
- Berton, T., Mayhoub, F., Chardon, K., Duca, R.-C., Lestremau, F., Bach, V. r., and Tack, K. (2014). Development of an analytical strategy based on LC-MS/MS for the measurement of different classes of pesticides and theirs metabolites in meconium: Application and characterisation of foetal exposure in France. *Environmental Research* **132**, 311-320.
- Bhushan, B., Saxena, P. N., and Saxena, N. (2013). Biochemical and Histological Changes in Rat Liver Caused by Cypermethrin and Beta-Cyfluthrin. *Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju* **64**, 57-67.
- Blaauboer, B. J. (2010). Biokinetic Modeling and in Vitro-in Vivo Extrapolations. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B-Critical Reviews* **13**, 242-252.
- Blanchard, N., Richert, L., Notter, B., Delobel, F., David, P., Coassolo, P., and Lave, T. (2004). Impact of serum on clearance predictions obtained from suspensions and primary cultures of rat hepatocytes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **23**, 189-199.
- Bohets, H., Annaert, P., Mannens, G., Van Beijsterveldt, L., Anciaux, K., Verboven, P., Meuldermans, W., and Lavrijsen, K. (2001). Strategies for absorption screening in drug discovery and development. *Current topics in medicinal chemistry* **1**, 367-83.
- Bouvier, G., Seta, N., Vigouroux-Villard, A., Blanchard, O., and Momas, I. (2005). Insecticide urinary metabolites in nonoccupationally exposed populations. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B-Critical Reviews* **8**, 485-512.
- Bradberry, S. M., Cage, S. A., Proudfoot, A. T., and Vale, J. A. (2005). Poisoning due to pyrethroids. *Toxicological reviews* **24**, 93-106.
- Breckenridge, C. B., Holden, L., Sturgess, N., Weiner, M., Sheets, L., Sargent, D., Soderlund, D. M., Choi, J. S., Symington, S., Clark, J. M., Burr, S., and Ray, D. (2009). Evidence for a separate mechanism of toxicity for the Type I and the Type II pyrethroid insecticides. *Neurotoxicology* **30**, S17-S31.
- Bricks, T., Paullier, P., Legendre, A., Fleury, M.-J., Zeller, P., Merlier, F., Anton, P. M., and Leclerc, E. (2014). Development of a new microfluidic platform integrating co-cultures of intestinal and liver cell lines. *Toxicology in Vitro* **28**, 885-895.
- Brochot, C., and Bois, F. Y. (2005). Use of a chemical probe to increase safety for human volunteers in toxicokinetic studies. *Risk Analysis* **25**, 1559-1571.
- Brochot, C., Toth, J., and Bois, F. Y. (2005). Lumping in pharmacokinetics. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics* **32**, 719-736.
- Brochot, C. I., Smith, T. J., and Bois, F. d. r. Y. (2007). Development of a physiologically based toxicokinetic model for butadiene and four major metabolites in humans: Global sensitivity analysis for experimental design issues. *Chemico-Biological Interactions* **167**, 168-183.
- Brown, H. S., Chadwick, A., and Houston, J. B. (2008). Use of isolated hepatocyte preparations for cytochrome P450 inhibition studies: Comparison with microsomes for K-i determination *Drug Metabolism and Disposition* **36**, 203-203.
- Brown, H. S., Griffin, M., and Houston, J. B. (2007). Evaluation of cryopreserved human hepatocytes as an alternative in vitro system to microsomes for the prediction of metabolic clearance. *Drug Metabolism and Disposition* **35**, 293-301.
- Brown, R. P., Delp, M. D., Lindstedt, S. L., Rhomberg, L. R., and Beliles, R. P. (1997). Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models. *Toxicology and Industrial Health* **13**, 407-484.

- Burns, C. J., McIntosh, L. J., Mink, P. J., Jurek, A. M., and Li, A. A. (2013). Pesticide Exposure and Neurodevelopmental Outcomes: Review of the Epidemiologic and Animal Studies. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B-Critical Reviews* **16**, 127-283.
- Campbell, J. L., Jr., Clewell, R. A., Gentry, P. R., Andersen, M. E., and Clewell, H. J., 3rd (2012). Physiologically based pharmacokinetic/toxicokinetic modeling. In *Methods in molecular biology*, Vol. 929, pp. 439-99, Clifton, N.J.
- Cantalamesa, F. (1993). Acute toxicity of two pyrethroids, permethrin, and cypermethrin in neonatal and adult rats. *Archives of Toxicology* **67**, 510-513.
- CEAEQ (2009). Protocole pour la validation d'une méthode d'analyse en chimie. Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, Québec.
- Channa, K. R., Rollin, H. B., Wilson, K. S., Nost, T. H., Odland, J. O., Naik, I., and Sandanger, T. M. (2012). Regional variation in pesticide concentrations in plasma of delivering women residing in rural Indian Ocean coastal regions of South Africa. *Journal of Environmental Monitoring* **14**, 2952-2960.
- Chiu, W. A., Barton, H. A., DeWoskin, R. S., Schlosser, P., Thompson, C. M., Sonawane, B., Lipscomb, J. C., and Krishnan, K. (2007). Evaluation of physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment. *Journal of Applied Toxicology* **27**, 218-237.
- Choi, J., Rose, R. L., and Hodgson, E. (2002). In vitro human metabolism of permethrin: the role of human alcohol and aldehyde dehydrogenases. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **74**, 117-128.
- Chow, E. C. Y., and Pang, S. K. (2013). Why We Need Proper PBPK Models to Examine Intestine and Liver Oral Drug Absorption. *Current Drug Metabolism* **14**, 57-79.
- Clark, L. H., Woodrow Setzer, R., and Barton, H. A. (2004). Framework for Evaluation of Physiologically-Based Pharmacokinetic Models for Use in Safety or Risk Assessment. *Risk Analysis* **24**, 1697-1717.
- Clewell, H. J., Andersen, M. E., and Barton, H. A. (2002). A consistent approach for the application of pharmacokinetic modeling in cancer and noncancer risk assessment. *Environmental Health Perspectives* **110**, 85-93.
- Clewell, H. J., Tan, Y. M., Campbell, J. L., and Andersen, M. E. (2008). Quantitative interpretation of human biomonitoring data. *Toxicology and Applied Pharmacology* **231**, 122-133.
- Clewell, R. A., and Clewell, H. J. (2008). Development and specification of physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **50**, 129-143.
- Corcellas, C., Feo, M. L., Torres, J. P., Malm, O., Ocampo-Duque, W., Eljarrat, E., and Barcelo, D. (2012). Pyrethroids in human breast milk: Occurrence and nursing daily intake estimation. *Environment International* **47**, 17-22.
- Corrion, M. L., Ostrea, E. M., Bielawski, D. M., Posecion, N. C., and Seagraves, J. J. (2005). Detection of prenatal exposure to several classes of environmental toxicants and their metabolites by gas chromatography-mass spectrometry in maternal and umbilical cord blood. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **822**, 221-229.
- Côté, J., Bonvalot, Y., Carrier, G., Lapointe, C., Fuhr, U., Tomalik-Scharte, D., Wachall, B., and Bouchard, M. (2014). A Novel Toxicokinetic Modeling of Cypermethrin and Permethrin and Their Metabolites in Humans for Dose Reconstruction from Biomarker Data. *Plos One* **9**.
- Couture, C., Fortin, M. C., Carrier, G., Dumas, P., Tremblay, C., and Bouchard, M. (2009). Assessment of Exposure to Pyrethroids and Pyrethrins in a Rural Population of the Monteregie Area, Quebec, Canada. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene* **6**, 341-352.
- Crow, J. A., Borazjani, A., Potter, P. M., and Ross, M. K. (2007). Hydrolysis of pyrethroids by human and rat tissues: Examination of intestinal, liver and serum carboxylesterases. *Toxicology and Applied Pharmacology* **221**, 1-12.
- Darwich, A. S., Neuhoff, S., Jamei, M., and Rostami-Hodjegan, A. (2010). Interplay of Metabolism and Transport in Determining Oral Drug Absorption and Gut Wall Metabolism: A Simulation

- Assessment Using the "Advanced Dissolution, Absorption, Metabolism (ADAM)" Model. *Current Drug Metabolism* **11**, 716-729.
- Dobrinas, S., Stanciu, G., Soceanu, A., and Culea, A. (2011). Analysis of organochlorine and pyrethroid pesticide residues in baby food samples. *Ovidius University Annals of Chemistry* **22**, 107-112.
- Dokoumetzidis, A., and Aarons, L. (2009). A method for robust model order reduction in pharmacokinetics. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics* **36**, 613-628.
- Dong, H. R., Bi, P. Y., and Xi, Y. L. (2008). Determination of pyrethroid pesticide residues in vegetables by solvent sublation followed by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science* **46**, 622-626.
- Ducauze, C. (2014). L'analyse chimique : choix et validation d'une méthode d'analyse. In Chimie analytique, analyse chimique et chimométrie - concept, démarche et méthodes. (T. e. D. Lavoisier, ed.
- Eadsforth, C. V., and Baldwin, M. K. (1983). Human Dose-Excretion Studies with the Pyrethroid Insecticide, Cypermethrin. *Xenobiotica* **13**, 67-72.
- Edgington, A. N., Schmitt, W., and Willmann, S. (2006). Development and evaluation of a generic physiologically based pharmacokinetic model for children. *Clinical Pharmacokinetics* **45**, 1013-1034.
- EFSA (2013). The 2010 European Union Report on Pesticide Residues in Food. *EFSA Journal* **11**, 3130.
- Egeghy, P. P., Cohen Hubal, E. A., Tolve, N. S., Melnyk, L. J., Morgan, M. K., Fortmann, R. C., and Sheldon, L. S. (2011). Review of Pesticide Urinary Biomarker Measurements from Selected US EPA Children's Observational Exposure Studies. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **8**, 1727-1754.
- Egerer, E., Rossbach, B., Muttray, A., Schneider, M., and Letzel, S. (2004). Biomonitoring of pyrethroid metabolites in environmental medicine. *Umweltmed Forsh Prax* **9**.
- Ehrhardt, C., Kim, K.-J., Schaefer, U. F., Hansen, S., Schneider, M., Contreras, J. L., and Lehr, C.-M. (2008). Models for Skin Absorption and Skin Toxicity Testing. In Drug Absorption Studies, Vol. VII, pp. 3-33. Springer US.
- Eisenthal, R., and Cornish-Bowden, A. (1974). Direct Linear Plot - New Graphical Procedure for Estimating Enzyme Kinetic-Parameters. *Biochemical Journal* **139**, 715-720.
- Elbetieha, A., Da'as, S. I., Khamas, W., and Darmani, H. (2001). Evaluation of the toxic potentials of cypermethrin pesticide on some reproductive and fertility parameters in the male rats. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **41**, 522-528.
- Elliott, M., Farnham, A. W., Janes, N. F., Needham, P. H., Pulman, D. A., and Stevenson, J. H. (1973). A Photostable Pyrethroid. *Nature* **246**, 169-170.
- FEA (2008). German environmental survey for children 2003-2006 (GerES IV) - Human biomonitoring - Levels of selected substances in blood and urine of children in Germany. Federal Environment Agency, Berlin.
- Flannigan, S. A., Tucker, S. B., Key, M. M., Ross, C. E., Fairchild, E. J., Grimes, B. A., and Harrist, R. B. (1985). Synthetic Pyrethroid Insecticides - a Dermatological Evaluation. *British Journal of Industrial Medicine* **42**, 363-372.
- Fortin, M. C., Bouchard, M., Carrier, G., and Dumas, P. (2008a). Biological monitoring of exposure to pyrethrins and pyrethroids in a metropolitan population of the Province of Quebec, Canada. *Environmental Research* **107**, 343-350.
- Fortin, M. C., Carrier, G., and Bouchard, M. (2008b). Concentrations versus amounts of biomarkers in urine: a comparison of approaches to assess pyrethroid exposure. *Environmental Health* **7**, 13.
- Fukazawa, T., Yamazaki, Y., and Miyamoto, Y. (2010). Reduction of non-specific adsorption of drugs to plastic containers used in bioassays or analyses. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **61**, 329-333.
- Gaohua, L., Abduljalil, K., Jamei, M., Johnson, T. N., and Rostami-Hodjegan, A. (2012). A pregnancy physiologically based pharmacokinetic (p-PBPK) model for disposition of drugs metabolized by CYP1A2, CYP2D6 and CYP3A4. *British journal of clinical pharmacology* **74**, 873-85.

- Gaughan, L. C., Unai, T., and Casida, J. E. (1977). Permethrin Metabolism in Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **25**, 9-17.
- Gelman, A., Bois, F., and Jiang, J. M. (1996). Physiological pharmacokinetic analysis using population modeling and informative prior distributions. *Journal of the American Statistical Association* **91**, 1400-1412.
- Gentry, P. R., Covington, T. R., and Clewell, H. J. (2003). Evaluation of the potential impact of pharmacokinetic differences on tissue dosimetry in offspring during pregnancy and lactation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **38**, 1-16.
- Gerlowski, L. E., and Jain, R. K. (1983). Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling - Principles and Applications. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **72**, 1103-1127.
- Giacomini, K., and Sugiyama, Y. (2010). Membrane transporters and drug response. In Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Twelfth Edition (L. L. Brunton, ed., Vol. 5. Mc Graw-Hill Professional.
- Giacomini, K. M., Huang, S.-M., Tweedie, D. J., Benet, L. Z., Brouwer, K. L. R., Chu, X., Dahlin, A., Evers, R., Fischer, V., Hillgren, K. M., Hoffmaster, K. A., Ishikawa, T., Keppler, D., Kim, R. B., Lee, C. A., Niemi, M., Polli, J. W., Sugiyama, Y., Swaan, P. W., Ware, J. A., Wright, S. H., Yee, S. W., Zamek-Gliszczynski, M. J., and Zhang, L. (2010). Membrane transporters in drug development. *Nature reviews. Drug discovery* **9**, 215-36.
- Gilks, W. R. (2005). Markov Chain Monte Carlo. In Encyclopedia of Biostatistics (P. Armitage and T. Colton, eds.). John Wiley & Sons, Ltd.
- Gill, K. L., Gertz, M., Houston, J. B., and Galetin, A. (2013). Application of a Physiologically Based Pharmacokinetic Model to Assess Propofol Hepatic and Renal Glucuronidation in Isolation: Utility of In Vitro and In Vivo Data. *Drug Metabolism and Disposition* **41**, 744-753.
- Godin, S. J., Crow, J. A., Scollon, E. J., Hughes, M. F., DeVito, M. J., and Ross, M. K. (2007). Identification of rat and human cytochrome P450 isoforms and a rat serum esterase that metabolize the pyrethroid insecticides deltamethrin and esfenvalerate. *Drug Metabolism and Disposition* **35**, 1664-1671.
- Godin, S. J., DeVito, M. J., Hughes, M. F., Ross, D. G., Scollon, E. J., Starr, J. M., Setzer, R. W., Conolly, R. B., and Tornero-Velez, R. (2010). Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling of Deltamethrin: Development of a Rat and Human Diffusion-Limited Model. *Toxicological Sciences* **115**, 330-343.
- Godin, S. J., Scollon, E. J., Hughes, M. F., Potter, P. M., DeVito, M. J., and Ross, M. K. (2006). Species differences in the in vitro metabolism of deltamethrin and esfenvalerate: Differential oxidative and hydrolytic metabolism by humans and rats. *Drug Metabolism and Disposition* **34**, 1764-1771.
- Gotoh, Y., Kawakami, M., Matsumoto, N., and Okada, Y. (1998). Permethrin emulsion ingestion: Clinical manifestations and clearance of isomers. *Journal of Toxicology-Clinical Toxicology* **36**, 57-61.
- Gray, A. J., and Rickard, J. (1982). The Toxicokinetics of Deltamethrin in Rats after Intravenous Administration of a Toxic Dose. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **18**, 205-215.
- Gray, A. J., and Soderlund, D. M. (1985). Mammalian toxicology of pyrethroids. In Insecticides (D. H. Huston and T. R. Roberts, eds.). John Wiley & Sons Ltd.
- Groothuis, F. A., Heringa, M. B., Nicol, B., Hermens, J. L. M., Blaauboer, B. J., and Kramer, N. I. (2013). Dose metric considerations in in vitro assays to improve quantitative in vitro-in vivo dose extrapolations. *Toxicology*.
- Gueguen, Y., Mouzat, K., Ferrari, L., Tissandie, E., Lobaccaro, J. M. A., Batt, A. M., Paquet, F., Voisin, P., Aigueperse, J., Gourmelon, P., and Soudi, M. (2006). Cytochromes P450: xenobiotic metabolism, regulation and clinical importance. *Annales De Biologie Clinique* **64**, 535-548.
- Guillouzo, A., Corlu, A., Aninat, C., Glaise, D., Morel, F., and Guguen-Guillouzo, C. (2007). The human hepatoma HepaRG cells: A highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chemico-Biological Interactions* **168**, 66-73.

- Hack, C. E. (2006). Bayesian analysis of physiologically based toxicokinetic and toxicodynamic models. *Toxicology* **221**, 241-248.
- Hacker, M., Messer, W., and Bachmann, K. (2009). *Pharmacology : Principles and Practice*. Academic Press.
- Han, Y., Xia, Y., Han, J., Zhou, J., Wang, S., Zhu, P., Zhao, R., Jin, N., Song, L., and Wang, X. (2008). The relationship of 3-PBA pyrethroids metabolite and male reproductive hormones among non-occupational exposure males. *Chemosphere* **72**, 785-790.
- He, F. S., Wang, S. G., Liu, L. H., Chen, S. Y., Zhang, Z. W., and Sun, J. X. (1989). Clinical Manifestations and Diagnosis of Acute Pyrethroid Poisoning. *Archives of Toxicology* **63**, 54-58.
- Heder, A. F., Hirsch-Ernst, K. I., Bauer, D., Kahl, G. F., and Desel, H. (2001). Induction of cytochrome P4502B1 by pyrethroids in primary rat hepatocyte cultures. *Biochemical Pharmacology* **62**, 71-79.
- Heredia-Ortiz, R., Bouchard, M., Marie-Desvergne, C., Viau, C., and Maitre, A. (2011). Modeling of the Internal Kinetics of Benzo(a)pyrene and 3-Hydroxybenzo(a)pyrene Biomarker from Rat Data. *Toxicological Sciences* **122**, 275-287.
- Heudorf, U., and Angerer, J. (2001). Metabolites of pyrethroid insecticides in urine specimens: Current exposure in an urban population in Germany. *Environmental Health Perspectives* **109**, 213-217.
- Heudorf, U., Angerer, J., and Drexler, H. (2004). Current internal exposure to pesticides in children and adolescents in Germany: urinary levels of metabolites of pyrethroid and organophosphorus insecticides. *International Archives of Occupational and Environmental Health* **77**, 67-72.
- Heudorf, U., Butte, W., Schulz, C., and Angerer, J. (2006). Reference values for metabolites of pyrethroid and organophosphorous insecticides in urine for human biomonitoring in environmental medicine. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **209**, 293-299.
- Hewitt, N. J., Lechon, M. J., Houston, J. B., Hallifax, D., Brown, H. S., Maurel, P., Kenna, J. G., Gustavsson, L., Lohmann, C., Skonberg, C., Guillouzo, A., Tuschl, G., Li, A. P., LeCluyse, E., Groothuis, G. M. M., and Hengstler, J. G. (2007). Primary Hepatocytes: Current Understanding of the Regulation of Metabolic Enzymes and Transporter Proteins, and Pharmaceutical Practice for the Use of Hepatocytes in Metabolism, Enzyme Induction, Transporter, Clearance, and Hepatotoxicity Studies. *Drug Metabolism Reviews* **39**, 159-234.
- Houston, J. B. (1994a). Relevance of in vitro kinetic parameters to in vivo metabolism of xenobiotics. *Toxicology in Vitro* **8**, 507-512.
- Houston, J. B. (1994b). Utility of in vitro drug metabolism data in predicting in vivo metabolic clearance. *Biochemical Pharmacology* **47**, 1469-79.
- Houston, J. B., and Kenworthy, K. E. (2000). In Vitro-In Vivo Scaling of CYP Kinetic Data Not Consistent with the Classical Michaelis-Menten Model, Vol. 28, pp. 246-254.
- Huang, W., Lee, S., and Yu, L. (2009). Mechanistic Approaches to Predicting Oral Drug Absorption. *The AAPS Journal* **11**, 217-224.
- ICRP (2002). Basic anatomical and physiological data for use in radiological protection: reference values. A report of age- and gender-related differences in the anatomical and physiological characteristics of reference individuals. ICRP Publication 89. *Annals of the ICRP* **32**, 5-265.
- Imai, K., Yoshinaga, J., Yoshikane, M., Shiraishi, H., Mieno, M. N., Yoshiike, M., Nozawa, S., and Iwamoto, T. (2014). Pyrethroid insecticide exposure and semen quality of young Japanese men. *Reproductive Toxicology* **43**, 38-44.
- InVS (2013). Exposition de la population française aux substances chimiques de l'environnement Vol. Tome 2 - Polychlorobiphényles (PCB-NDL) et pesticides, p. 178 p. Institut national de veille sanitaire, St Maurice.
- IPCS (1986). Principles of toxicokinetic studies. International Programme on Chemical Safety, 9 août 2014. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc57.htm#PartNumber:1>

- IPCS (2010). Characterization and application of physiologically based pharmacokinetic models in risk assessment. World Health Organization - International Programme on Chemical Safety, Geneva.
- Irvine, J. D., Takahashi, L., Lockhart, K., Cheong, J., Tolan, J. W., Selick, H. E., and Grove, J. R. (1999). MDCK (Madin–Darby canine kidney) cells: A tool for membrane permeability screening. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **88**, 28-33.
- Ishmael, J., and Litchfield, M. H. (1988). Chronic Toxicity and Carcinogenic Evaluation of Permethrin in Rats and Mice, Vol. 11, pp. 308-322.
- Jancova, P., Anzenbacher, P., and Anzenbacherova, E. (2010). Phase II Drug Metabolizing Enzymes. *Biomedical Papers-Olomouc* **154**, 103-116.
- Jardim, A. N. O., and Caldas, E. D. (2014). Brazilian monitoring programs for pesticide residues in food - Results from 2001 to 2010. *Food Control* **25**, 607-616.
- Jewell, C., Bennett, P., Mutch, E., Ackermann, C., and Williams, F. M. (2007). Inter-individual variability in esterases in human liver. *Biochemical Pharmacology* **74**, 932-939.
- Jin, Y., Wang, W., Xu, C., Fu, Z., and Liu, W. (2008). Induction of hepatic estrogen-responsive gene transcription by permethrin enantiomers in male adult zebrafish. *Aquatic Toxicology* **88**, 146-152.
- Jin, Y. X., Liu, J. W., Wang, L. G., Chen, R. J., Zhou, C., Yang, Y. F., Liu, W. P., and Fu, Z. W. (2012). Permethrin exposure during puberty has the potential to enantioselectively induce reproductive toxicity in mice. *Environment International* **42**, 144-151.
- Kim, K. B., Anand, S. S., Kim, H. J., White, C. A., and Bruckner, J. V. (2008). Toxicokinetics and tissue distribution of deltamethrin in adult Sprague-Dawley rats. *Toxicological Sciences* **101**, 197-205.
- Kim, K. B., Anand, S. S., Kim, H. J., White, C. A., Fisher, J. W., Tornero-Velez, R., and Bruckner, J. V. (2010). Age, Dose, and Time-Dependency of Plasma and Tissue Distribution of Deltamethrin in Immature Rats. *Toxicological Sciences* **115**, 354-368.
- Kimbrough, R. D. (1995). Polychlorinated-Biphenyls (Pcbs) and Human Health - an Update. *Critical Reviews in Toxicology* **25**, 133-163.
- Knaak, J. B., Dary, C. C., Zhang, X. F., Gerlach, R. W., Tornero-Velez, R., Chang, D. T., Goldsmith, R., and Blancato, J. N. (2012). Parameters for Pyrethroid Insecticide QSAR and PBPK/PD Models for Human Risk Assessment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* **219**, 1-114.
- Kohn, M. C., and Melnick, R. L. (1993). Species-Differences in the Production and Clearance of 1,3-Butadiene Metabolites - a Mechanistic Model Indicates Predominantly Physiological, Not Biochemical, Control. *Carcinogenesis* **14**, 619-628.
- Kortenkamp, A. (2008). Breast cancer and exposure to hormonally active chemicals: An appraisal of the scientific evidence. Centre for Toxicology, The School of Pharmacy, London.
- Kramer, N. I., Krismartina, M., Rico-Rico, A., Blaauboer, B. J., and Hermens, J. L. M. (2012). Quantifying Processes Determining the Free Concentration of Phenanthrene in Basal Cytotoxicity Assays. *Chemical Research in Toxicology* **25**, 436-445.
- Lamb, M. R., Taylor, S., Liu, X. H., Wolff, M. S., Borrell, L., Matte, T. D., Susser, E. S., and Factor-Litvak, P. (2006). Prenatal exposure to polychlorinated biphenyls and postnatal growth: A structural analysis. *Environmental Health Perspectives* **114**, 779-785.
- Lavado, R., Li, J., Rimoldi, J. M., and Schlenk, D. (2014). Evaluation of the stereoselective biotransformation of permethrin in human liver microsomes: Contributions of cytochrome P450 monooxygenases to the formation of estrogenic metabolites. *Toxicology Letters* **226**, 192-197.
- Lavé, T., Coassolo, P., and Reigner, B. (1999). Prediction of hepatic metabolic clearance based on interspecies allometric scaling techniques and in vitro in vivo correlations. *Clinical Pharmacokinetics* **36**, 211-231.
- Lawrence, L. J., and Casida, J. E. (1982). Pyrethroid toxicology: Mouse intracerebral structure-toxicity relationships. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **18**, 9-14.

- Le Grand, R., Dulaurent, S., Gaulier, J. M., Saint-Marcoux, F., Moesch, C., and Lachatre, G. (2012). Simultaneous determination of five synthetic pyrethroid metabolites in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Application to 39 persons without known exposure to pyrethroids. *Toxicology Letters* **210**, 248-253.
- Lee, K. S., and Kim, S. K. (2011). Direct and metabolism-dependent cytochrome P450 inhibition assays for evaluating drug-drug interactions. *Journal of Applied Toxicology* **33**, 100-108.
- Leng, G., and Gries, W. (2005). Simultaneous determination of pyrethroid and pyrethrin metabolites in human urine by gas chromatography-high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **814**, 285-294.
- Leng, G., Gries, W., and Selim, S. (2006). Biomarker of pyrethrum exposure. *Toxicology Letters* **162**, 195-201.
- Leng, G., Kuhn, K. H., and Idel, H. (1997). Biological monitoring of pyrethroids in blood and pyrethroid metabolites in urine: Applications and limitations. *Science of the Total Environment* **199**, 173-181.
- Lequesne, P. M., Maxwell, I. C., and Butterworth, S. T. G. (1981). Transient Facial Sensory Symptoms Following Exposure to Synthetic Pyrethroids - a Clinical and Electro-Physiological Assessment. *Neurotoxicology* **2**, 1-11.
- Li, A. P. (2007). Human hepatocytes: Isolation, cryopreservation and applications in drug development. *Chemico-Biological Interactions* **168**, 16-29.
- Li, B., Sedlacek, M., Manoharan, I., Boopathy, R., Duysen, E. G., Masson, P., and Lockridge, O. (2005). Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but not carboxylesterase, are present in human plasma. *Biochemical Pharmacology* **70**, 1673-1684.
- Li, Z. J., Chen, C. L., Ai, D. Y., Wang, C. M., Li, J., Qi, Y. H., Yi, W. X., Shen, H. C., and Cao, J. Y. (2012). Pharmacokinetics and tissue residues of hydrochloric acid albendazole sulfoxide and its metabolites in crucian carp (*Carassius auratus*) after oral administration. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **33**, 197-204.
- Liang, Y.-J., Wang, H.-P., Long, D.-X., Li, W., and Wu, Y.-J. (2013). A metabonomic investigation of the effects of 60 days exposure of rats to two types of pyrethroid insecticides. *Chemico-Biological Interactions* **206**, 302-308.
- Lipscomb, J. C., Haddad, S., Poet, T., and Krishnan, K. (2012). Physiologically-Based Pharmacokinetic (PBPK) Models in Toxicity Testing and Risk Assessment. In *New Technologies for Toxicity Testing* (M. Balls, R. Combes and N. Bhogal, eds.), Vol. 745, pp. 76-95. Springer-Verlag Berlin.
- Lipscomb, J. C., and Kedderis, G. L. (2002). Incorporating human interindividual biotransformation variance in health risk assessment. *Science of the Total Environment* **288**, 13-21.
- Lipscomb, J. C., and Poet, T. S. (2008). In vitro measurements of metabolism for application in pharmacokinetic modeling. *Pharmacology & Therapeutics* **118**, 82-103.
- Loizou, G., Spendiff, M., Barton, H. A., Bessems, J., Bois, F. Y., d'Yvoire, M. B., Buist, H., Clewell, H. J., Meek, B., Gundert-Remy, U., Goerlitz, G., and Schmitt, W. (2008). Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: The first steps. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **50**, 400-411.
- Lopez, S., France, J., Gerrits, W. J. J., Dhanoa, M. S., Humphries, D. J., and Dijkstra, J. (2000). A generalized Michaelis-Menten equation for the analysis of growth. *Journal of Animal Science* **78**, 1816-1828.
- Louisse, J., de Jong, E., van de Sandt, J. J. M., Blaauboer, B. J., Woutersen, R. A., Piersma, A. H., Rietjens, I., and Verwei, M. (2010). The Use of In Vitro Toxicity Data and Physiologically Based Kinetic Modeling to Predict Dose-Response Curves for In Vivo Developmental Toxicity of Glycol Ethers in Rat and Man. *Toxicological Sciences* **118**, 470-484.
- Lu, C. S., Barr, D. B., Pearson, M., Bartell, S., and Bravo, R. (2006). A longitudinal approach to assessing urban and suburban children's exposure to pyrethroid pesticides. *Environmental Health Perspectives* **114**, 1419-1423.
- Luecke, R. H., Wosilait, W. D., Pearce, B. A., and Young, J. F. (1994). A Physiologically-Based Pharmacokinetic Computer-Model for Human-Pregnancy. *Teratology* **49**, 90-103.

- Lyons, M. A., Yang, R. S. H., Mayeno, A. N., and Reisfeld, B. (2008). Computational toxicology of chloroform: Reverse dosimetry using Bayesian inference, Markov chain Monte Carlo simulation, and human biomonitoring data. *Environmental Health Perspectives* **116**, 1040-1046.
- Marion, M.-J., Hantz, O., and Durantel, D. (2010). The HepaRG cell line: biological properties and relevance as a tool for cell biology, drug metabolism, and virology studies. *Methods in molecular biology* **640**, 261-72.
- Marshall, S., Gennings, C., Teuschler, L. K., Stork, L. G., Tornero-Velez, R., Crofton, K. M., and Rice, G. E. (2013). An Empirical Approach to Sufficient Similarity: Combining Exposure Data and Mixtures Toxicology Data. *Risk Analysis* **33**, 1582-1595.
- Mazur, C. S., Kenneke, J. F., Tebes-Stevens, C., Okino, M. S., and Lipscomb, J. C. (2007). In vitro metabolism of the fungicide and environmental contaminant trans-bromuconazole and implications for risk assessment. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A* **70**, 1241-50.
- McDougal, J. N., Jepson, G. W., Clewell, H. J., Macnaughton, M. G., and Andersen, M. E. (1986). A Physiological Pharmacokinetic Model for Dermal Absorption of Vapors in the Rat. *Toxicology and Applied Pharmacology* **85**, 286-294.
- McGinnity, D. F., Soars, M. G., Urbanowicz, R. A., and Riley, R. J. (2004). Evaluation of fresh and cryopreserved hepatocytes as in vitro drug metabolism tools for the prediction of metabolic clearance. *Drug Metabolism and Disposition* **32**, 1247-1253.
- McMullin, T. S., Andersen, M. E., Tessari, J. D., Cranmer, B., and Hanneman, W. H. (2007a). Estimating constants for metabolism of atrazine in freshly isolated rat hepatocytes by kinetic modeling. *Toxicology in Vitro* **21**, 492-501.
- McMullin, T. S., Hanneman, W. H., Cranmer, B. K., Tessari, J. D., and Andersen, M. E. (2007b). Oral absorption and oxidative metabolism of atrazine in rats evaluated by physiological modeling approaches. *Toxicology* **240**, 1-14.
- Meek, B. M. E., Barton, H. A., Bessems, J. G., Lipscomb, J. C., and Kannan, K. (2013). Case study illustrating the WHO IPCS guidance on characterization and application of physiologically based pharmacokinetic models in risk assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **66**, 116-129.
- Meeker, J. D., Barr, D. B., and Hauser, R. (2006). Thyroid hormones in relation to urinary metabolites of non-persistent insecticides in men of reproductive age. *Reproductive Toxicology* **22**, 437-442.
- Meeker, J. D., Barr, D. B., and Hauser, R. (2008). Human semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary metabolites of pyrethroid insecticides. *Human Reproduction* **23**, 1932-1940.
- Meeker, J. D., Barr, D. B., and Hauser, R. (2009). Pyrethroid insecticide metabolites are associated with serum hormone levels in adult men. *Reproductive Toxicology* **27**, 155-160.
- Melnyk, L. J., Xue, J., Brown, G. G., McCombs, M., Nishioka, M., and Michael, L. C. (2014). Dietary intakes of pesticides based on community duplicate diet samples. *Science of the Total Environment* **468-469**, 785-90.
- Mezzetti, M., Ibrahim, J. G., Bois, F. Y., Ryan, L. M., Ngo, L., and Smith, T. J. (2003). A Bayesian compartmental model for the evaluation of 1,3-butadiene metabolism. *Journal of the Royal Statistical Society Series C-Applied Statistics* **52**, 291-305.
- Micallef, S., Brochot, C., and Bois, F. Y. (2005). L'analyse statistique bayésienne de données toxicocinétiques. *Environnement, Risques & Santé* **4**.
- Mielke, H., Abraham, K., Goetz, M., Vieth, B., Lampen, A., Luch, A., and Gundert-Remy, U. (2011). Physiologically based toxicokinetic modelling as a tool to assess target organ toxicity in route-to-route extrapolation-The case of coumarin. *Toxicology Letters* **202**, 100-110.
- Mikata, K., Isobe, N., and Kaneko, H. (2012). Biotransformation and enzymatic reactions of synthetic pyrethroids in mammals. *Topics in current chemistry* **314**, 113-35.

- Mirfazaelian, A., Kim, K. B., Anand, S. S., Kim, H. J., Tornero-Velez, R., Bruckner, J. V., and Fisher, J. W. (2006). Development of a physiologically based pharmacokinetic model for deltamethrin in the adult male Sprague-Dawley rat. *Toxicological Sciences* **93**, 432-442.
- Miyamoto, J. (1976). Degradation, Metabolism and Toxicity of Synthetic Pyrethroids. *Environmental Health Perspectives* **14**, 15-28.
- Morgan, E. W., Yan, B. F., Greenway, D., Petersen, D. R., and Parkinson, A. (1994). Purification and Characterization of 2 Rat-Liver Microsomal Carboxylesterases (Hydrolase-a and Hydrolase-B). *Archives of Biochemistry and Biophysics* **315**, 495-512.
- Morgan, M. K. (2012). Children's Exposures to Pyrethroid Insecticides at Home: A Review of Data Collected in Published Exposure Measurement Studies Conducted in the United States. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **9**, 2964-2985.
- Morgan, M. K., Sheldon, L. S., Croghan, C. W., Jones, P. A., Chuang, J. C., and Wilson, N. K. (2007). An observational study of 127 preschool children at their homes and daycare centers in Ohio: Environmental pathways to cis- and trans-permethrin exposure. *Environmental Research* **104**, 266-274.
- Mork, A.-K., Jonsson, F., and Johanson, G. (2009). Bayesian population analysis of a washin-washout physiologically based pharmacokinetic model for acetone. *Toxicology and Applied Pharmacology* **240**, 423-432.
- Moss, G. P., Dearden, J. C., Patel, H., and Cronin, M. T. D. (2002). Quantitative structure-permeability relationships (QSPRs) for percutaneous absorption. *Toxicology in Vitro* **16**, 299-317.
- Multigner, L., Ndong, J. R., Giusti, A., Romana, M., Delacroix-Maillard, H., Cordier, S., Jegou, B., Thome, J. P., and Blanchet, P. (2010). Chlordecone exposure and risk of prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology* **28**, 3457-62.
- Mumtaz, M., Fisher, J., Blount, B., and Ruiz, P. (2012). Application of physiologically based pharmacokinetic models in chemical risk assessment. *Journal of toxicology* **2012**, 904603.
- Nakamura, Y., Sugihara, K., Sone, T., Isobe, M., Ohta, S., and Kitamura, S. (2007). The in vitro metabolism of a pyrethroid insecticide, permethrin, and its hydrolysis products in rats. *Toxicology* **235**, 176-184.
- Nassif, M., Peter Brooke, J., Hutchinson, D. B. A., Kamel, O. M., and Anthony Savage, E. (1980). Studies with permethrin against bodylice in Egypt. *Pesticide Science* **11**, 679-684.
- Nestorov, I. (2007). Whole-body physiologically based pharmacokinetic models. *Expert Opinion on drug metabolism and Toxicology* **3**, 235-249.
- Nestorov, I. A., Aarons, L. J., Arundel, P. A., and Rowland, M. (1998). Lumping of whole-body physiologically based pharmacokinetic models. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics* **26**, 21-46.
- Netzaff, F., Lehr, C. M., Wertz, P. W., and Schaefer, U. F. (2005). The human epidermis models EpiSkin (R), SkinEthic (R) and EpiDerm (R): An evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **60**, 167-178.
- Nishi, K., Huang, H., Kamita, S. G., Kim, I.-H., Morisseau, C., and Hammock, B. D. (2006). Characterization of pyrethroid hydrolysis by the human liver carboxylesterases hCE-1 and hCE-2. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **445**, 115-123.
- NRC (2007). Applications of Toxicogenomic Technologies to predictive Toxicology and Risk assessment. National Research Council of the National Academies, Washington, D.C.
- Obach, R. S. (1999). Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic clearance data: An examination of in vitro half-life approach and nonspecific binding to microsomes. *Drug Metabolism and Disposition* **27**, 1350-1359.
- Ostrea, E. M., Jr., Reyes, A., Villanueva-Uy, E., Pacifico, R., Benitez, B., Ramos, E., Bernardo, R. C., Bielawski, D. M., Delaney-Black, V., Chiodo, L., Janisse, J. J., and Ager, J. W. (2012). Fetal exposure to propoxur and abnormal child neurodevelopment at 2 years of age. *Neurotoxicology* **33**, 669-675.

- Ostrea, E. M., Jr., Villanueva-Uy, E., Bielawski, D., Birn, S., and Janisse, J. J. (2014). Trends in long term exposure to propoxur and pyrethroids in young children in the Philippines. *Environmental Research* **131**, 13-16.
- Ouattara, D. A., Choi, S.-H., Sakai, Y., Pery, A. R. R., and Brochot, C. (2011). Kinetic modelling of in vitro cell-based assays to characterize non-specific bindings and ADME processes in a static and a perfused fluidic system. *Toxicology Letters* **205**, 310-319.
- Paine, S. W., Parker, A. J., Gardiner, P., Webborn, P. J. H., and Riley, R. J. (2008). Prediction of the pharmacokinetics of atorvastatin, cerivastatin, and indomethacin using kinetic models applied to isolated rat hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition* **36**, 1365-1374.
- Palmgrén, J. J., Mönkkönen, J., Korjamo, T., Hassinen, A., and Auriola, S. (2006). Drug adsorption to plastic containers and retention of drugs in cultured cells under in vitro conditions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **64**, 369-378.
- Pelkonen, O., and Turpeinen, M. (2007). In vitro-in vivo extrapolation of hepatic clearance: Biological tools, scaling factors, model assumptions and correct concentrations. *Xenobiotica* **37**, 1066-1089.
- Peyret, T., and Krishnan, K. (2011). QSARs for PBPK modelling of environmental contaminants. *Sar and Qsar in Environmental Research* **22**, 129-169.
- Poirier, A., Cascais, A. C., Funk, C., and Lave, T. (2009). Prediction of pharmacokinetic profile of valsartan in human based on in vitro uptake transport data. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics* **36**, 585-611.
- Poulin, P., and Theil, F.-P. (2000). A priori prediction of tissue:plasma partition coefficients of drugs to facilitate the use of physiologically-based pharmacokinetic models in drug discovery. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **89**, 16-35.
- Price, K., Haddad, S., and Krishnan, K. (2003). Physiological modeling of age-specific changes in the pharmacokinetics of organic chemicals in children. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A* **66**, 417-433.
- Price, K., and Krishnan, K. (2011). An integrated QSAR-PBPK modelling approach for predicting the inhalation toxicokinetics of mixtures of volatile organic chemicals in the rat. *Sar and Qsar in Environmental Research* **22**, 107-128.
- Prot, J.-M., Videau, O., Brochot, C., Legallais, C., Benech, H., and Leclerc, E. (2011). A cocktail of metabolic probes demonstrates the relevance of primary human hepatocyte cultures in a microfluidic biochip for pharmaceutical drug screening. *International Journal of Pharmaceutics* **408**, 67-75.
- Prot, J. M., Maciel, L., Bricks, T., Merlier, F., Cotton, J., Paullier, P., Bois, F. Y., and Leclerc, E. (2014). First Pass Intestinal and Liver Metabolism of Paracetamol in a Microfluidic Platform Coupled With a Mathematical Modeling as a Means of Evaluating ADME Processes in Humans. *Biotechnology and Bioengineering* **111**, 2027-2040.
- Raevsky, O. A., Fetisov, V. I., Trepalina, E. P., McFarland, J. W., and Schaper, K. J. (2000). Quantitative estimation of drug absorption in humans for passively transported compounds on the basis of their physico-chemical parameters. *Quantitative Structure-Activity Relationships* **19**, 366-374.
- Ramsey, J. C., and Andersen, M. E. (1984). A physiologically based description of the inhalation pharmacokinetics of styrene in rats and humans. *Toxicology and Applied Pharmacology* **73**, 159-175.
- Ray, D. E., and Forshaw, P. J. (2000). Pyrethroid insecticides: Poisoning syndromes, synergies, and therapy. *Journal of Toxicology-Clinical Toxicology* **38**, 95-101.
- Reddy, M. B., Clewell III, H. J., Lavé, T., and Andersen, M. E. (2013). Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling: A Tool for Understanding ADMET Properties and Extrapolating to Human. In *New Insights into Toxicity and Drug Testing* (D. S. Gowder, ed).
- Reddy, M. B., Yang, R. S. H., Clewell III, H. J., and Andersen, M. E. (2005). *Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling: Science and Applications*. John Wiley & Sons, Hoboken.

- Riley, R. J., McGinnity, D. F., and Austin, R. P. (2005). A unified model for predicting human hepatic, metabolic clearance from in vitro intrinsic clearance data in hepatocytes and microsomes. *Drug Metabolism and Disposition* **33**, 1304-1311.
- Riviere, Jim, E., Brooks, and James, D. (2011). *Predicting Skin Permeability from Complex Chemical Mixtures: Dependency of Quantitative Structure Permeation Relationships on Biology of Skin Model Used*. Oxford University Press, Oxford.
- Ross, M. K., Borazjani, A., Edwards, C. C., and Potter, P. M. (2006). Hydrolytic metabolism of pyrethroids by human and other mammalian carboxylesterases. *Biochemical Pharmacology* **71**, 657-669.
- Ross, M. K., Borazjani, A., Wang, R., Crow, J. A., and Xie, S. Q. (2012). Examination of the carboxylesterase phenotype in human liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **522**, 44-56.
- Rowland, M. (1985). Physiological Pharmacokinetic Models and Interanimal Species Scaling. *Pharmacology & Therapeutics* **29**, 49-68.
- Rowland, M., Peck, C., and Tucker, G. (2011). Physiologically-Based Pharmacokinetics in Drug Development and Regulatory Science. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **51**, 45-73.
- Sanghani, S. P., Quinney, S. K., Fredenburg, T. B., Davis, W. I., Murry, D. J., and Bosron, W. F. (2004). Hydrolysis of irinotecan and its oxidative metabolites, 7-ethyl-10-[4-N-(5-aminopentanoic acid)-1-piperidino] carbonyloxycamptothecin and 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-amino]-carbonyloxycamptothecin, by human carboxylesterases CES1A1, CES2, and a newly expressed carboxylesterase isoenzyme, CES3. *Drug Metabolism and Disposition* **32**, 505-511.
- Sannino, A., Bandini, M., and Bolzoni, L. (2003). Determination of pyrethroid pesticide residues in processed fruits and vegetables by gas chromatography with electron capture and mass spectrometric detection. *Journal of Aoac International* **86**, 101-108.
- Santé Canada (2010). Rapport sur la biosurveillance humaine des substances chimiques de l'environnement au Canada - Résultats de l'Enquête canadienne sur les mesures de la santé Cycle 1 (2007 à 2009), p. 300 Santé Canada, Ottawa.
- Sassine, A., Moura, S., Leo, V. M., and Bustillos, O. V. (2004). Cypermethrin residues determination in the milk of a lactating dairy cow by gas chromatography-ion trap mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology* **28**, 238-241.
- Satoh, T., and Hosokawa, M. (2006). Structure, function and regulation of carboxylesterases. *Chemico-Biological Interactions* **162**, 195-211.
- Satoh, T., and Hosokawa, M. (2010). Carboxylesterases: structure, function and polymorphism in mammals. *Journal of Pesticide Science* **35**, 218-228.
- Schettgen, T., Heudorf, U., Drexler, H., and Angerer, E. (2002a). Pyrethroid exposure of the general population - is this due to diet? *Toxicology Letters* **134**, 141-145.
- Schettgen, T., Koch, H. M., Drexler, H., and Angerer, J. (2002b). New gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of urinary pyrethroid metabolites in environmental medicine. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **778**, 121-130.
- Scollon, E. J., Starr, J. M., Godin, S. J., DeVito, M. J., and Hughes, M. F. (2009). In Vitro Metabolism of Pyrethroid Pesticides by Rat and Human Hepatic Microsomes and Cytochrome P450 Isoforms. *Drug Metabolism and Disposition* **37**, 221-228.
- Sethi, P. K., Muralidhara, S., Bruckner, J. V., and White, C. A. (2014). Measurement of plasma protein and lipoprotein binding of pyrethroids. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*.
- Shabir, G. A., Lough, W. J., Arain, S. A., and Bradshaw, T. K. (2007). Evaluation and application of best practice in analytical method validation. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **30**, 311-333.

- Shafer, T. J., Meyer, D. A., and Crofton, K. M. (2005). Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: Critical review and future research needs. *Environmental Health Perspectives* **113**, 123-136.
- Shafer, T. J., Rijal, S. O., and Gross, G. W. (2008). Complete inhibition of spontaneous activity in neuronal networks in vitro by deltamethrin and permethrin. *Neurotoxicology* **29**, 203-212.
- Shono, T., Ohsawa, K., and Casida, J. E. (1979). Metabolism of Trans-Permethrin and Cis-Permethrin, Trans-Cypermethrin, and Cis-Cypermethrin, and Decamethrin by Microsomal-Enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **27**, 316-325.
- Soderlund, D. M., Clark, J. M., Sheets, L. P., Mullin, L. S., Piccirillo, V. J., Sargent, D., Stevens, J. T., and Weiner, M. L. (2002). Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology* **171**, 3-59.
- Spencer, J., and O'Malley, M. (2006). Pyrethroid illnesses in California, 1996-2002. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (D. M. Whitacre, ed., Vol. 186, pp. 57-72).
- Starr, J., Graham, S., Stout li, D., Andrews, K., and Nishioka, M. (2008). Pyrethroid pesticides and their metabolites in vacuum cleaner dust collected from homes and day-care centers. *Environmental Research* **108**, 271-279.
- Starr, J. M., Graham, S. E., Ross, D. G., Tornero-Velez, R., Scollon, E. J., DeVito, M. J., Crofton, K. M., Wolansky, M. J., and Hughes, M. F. (2014). Environmentally relevant mixing ratios in cumulative assessments: A study of the kinetics of pyrethroids and their ester cleavage metabolites in blood and brain; and the effect of a pyrethroid mixture on the motor activity of rats. *Toxicology* **320**, 15-24.
- Starr, J. M., Scollon, E. J., Hughes, M. F., Ross, D. G., Graham, S. E., Crofton, K. M., Wolansky, M. J., DeVito, M. J., and Tornero-Velez, R. (2012). Environmentally Relevant Mixtures in Cumulative Assessments: An Acute Study of Toxicokinetics and Effects on Motor Activity in Rats Exposed to a Mixture of Pyrethroids. *Toxicological Sciences* **130**, 309-318.
- Stout, D. M., II, Bradham, K. D., Egeghy, P. P., Jones, P. A., Croghan, C. W., Ashley, P. A., Pinzer, E., Friedman, W., Brinkman, M. C., Nishioka, M. G., and Cox, D. C. (2009). American Healthy Homes Survey: A National Study of Residential Pesticides Measured from Floor Wipes. *Environmental Science & Technology* **43**, 4294-4300.
- Sugano, K., Kansy, M., Artursson, P., Avdeef, A., Bendels, S., Di, L., Ecker, G. F., Faller, B., Fischer, H., Gerebtzoff, G., Lennernaes, H., and Senner, F. (2010). Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport. *Nature Reviews Drug Discovery* **9**, 597-614.
- Takaku, T., Mikata, K., Matsui, M., Nishioka, K., Isobe, N., and Kaneko, H. (2011). In Vitro Metabolism of trans-Permethrin and Its Major Metabolites, PBalc and PBacid, in Humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**, 5001-5005.
- Tan, Y. M., Liao, K. H., and Clewell, H. J. (2007). Reverse dosimetry: interpreting trihalomethanes biomonitoring data using physiologically based pharmacokinetic modeling. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology* **17**, 591-603.
- Tange, S., Fujimoto, N., Uramaru, N., Sugihara, K., Ohta, S., and Kitamura, S. (2014). In vitro metabolism of cis- and trans-permethrin by rat liver microsomes, and its effect on estrogenic and anti-androgenic activities. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **37**, 996-1005.
- Teeguarden, J. G., Housand, C. J., Smith, J. N., Hinderliter, P. M., Gunawan, R., and Timchalk, C. A. (2013). A multi-route model of nicotine-cotinine pharmacokinetics, pharmacodynamics and brain nicotinic acetylcholine receptor binding in humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **65**, 12-28.
- Teuschler, L., Klaunig, J., Carney, E., Chambers, J., Conolly, R., Gennings, C., Giesy, J., Hertzberg, R., Klaassen, C., Kodell, R., Paustenbach, D., and Yang, R. (2002). Support of Science-Based Decisions Concerning the Evaluation of the Toxicology of Mixtures: A New Beginning. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **36**, 34-39.
- Timchalk, C., Nolan, R. J., Mendrala, A. L., Dittenber, D. A., Brzak, K. A., and Mattsson, J. L. (2002). A physiologically based pharmacokinetic and pharmacodynamic (PBPK/PD) model for the

- organophosphate insecticide chlorpyrifos in rats and humans. *Toxicological Sciences* **66**, 34-53.
- Tomalik-Scharte, D., Lazar, A., Meins, J., Bastian, B., Ihrig, M., Wachall, B., Jetter, A., Tantcheva-Poor, I., Mahrle, G., and Fuhr, U. (2005). Dermal absorption of permethrin following topical administration. *European Journal of Clinical Pharmacology* **61**, 399-404.
- Tornero-Velez, R., Davis, J., Scollon, E. J., Starr, J. M., Setzer, R. W., Goldsmith, M.-R., Chang, D. T., Xue, J., Zartarian, V., DeVito, M. J., and Hughes, M. F. (2012). A Pharmacokinetic Model of cis- and trans-Permethrin Disposition in Rats and Humans With Aggregate Exposure Application. *Toxicological Sciences* **130**, 33-47.
- Tornero-Velez, R., Mirfazaelian, A., Kim, K. B., Anand, S. S., Kim, H. J., Haines, W. T., Bruckner, J. V., and Fisher, J. W. (2010). Evaluation of deltamethrin kinetics and dosimetry in the maturing rat using a PBPK model. *Toxicology and Applied Pharmacology* **244**, 208-217.
- Trunnelle, K. J., Bennett, D. H., Tolve, N. S., Clifton, M. S., Davis, M. D., Calafat, A. M., Moran, R., Tancredi, D. J., and Hertz-Picciotto, I. (2014). Urinary Pyrethroid and Chlorpyrifos Metabolite Concentrations in Northern California Families and Their Relationship to Indoor Residential Insecticide Levels, Part of the Study of Use of Products and Exposure Related Behavior (SUPERB). *Environmental Science & Technology* **48**, 1931-1939.
- Ueyama, J., Hirose, N., Mochizuki, A., Kimata, A., Kamijima, M., Kondo, T., Takagi, K., Wakusawa, S., and Hasegawa, T. (2010a). Toxicokinetics of pyrethroid metabolites in male and female rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **30**, 88-91.
- Ueyama, J., Saito, I., and Kamijima, M. (2010b). Analysis and evaluation of pyrethroid exposure in human population based on biological monitoring of urinary pyrethroid metabolites. *Journal of Pesticide Science* **35**, 87-98.
- UIPP (2012). Archives : campagnes 2011-2012. Union des Industries et de la Protection des Plantes, 13 août 2014. <http://www.uipp.org/Services-pro/Chiffres-cles/archives-campagnes-2011-2012>
- US EPA (1992). Guidelines for Exposure Assessment. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- US EPA (2004). An examination of EPA risk assessment principles and practices. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC
- US EPA (2006). Approaches for the Application of Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Models and Supporting Data in Risk Assessment. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- US EPA (2007). Permethrin & Resmethrin (Pyrethroids) - Toxicity and Exposure Assessment for Children's Health (TEACH) Chemical Summary. US Environmental Protection Agency.
- US FDA (2011). Drug Development and Drug Interactions: Table of Substrates, Inhibitors and Inducers. US Food and Drug Administration, 12 septembre 2014. <http://www.fda.gov/drugs/developmentapprovalprocess/developmentresources/druginteractionslabeling/ucm093664.htm>
- Verschoye, R. D., and Aldridge, W. N. (1980). Structure-Activity-Relationships of Some Pyrethroids in Rats. *Archives of Toxicology* **45**, 325-329.
- Vos, J. G., Dybing, E., Greim, H. A., Ladefoged, O., Lambre, C., Tarazona, J. V., Brandt, I., and Vethaak, A. D. (2000). Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Critical Reviews in Toxicology* **30**, 71-133.
- Wagner, H., Kostka, K. H., Lehr, C. M., and Schaefer, U. F. (2001). Interrelation of permeation and penetration parameters obtained from in vitro experiments with human skin and skin equivalents. *Journal of Controlled Release* **75**, 283-295.
- Wakefield, J., and Racinepoon, A. (1995). An Application of Bayesian Population Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Models to Dose Recommendation. *Statistics in Medicine* **14**, 971-986.
- Wang, D., Kamijima, M., Imai, R., Suzuki, T., Kameda, Y., Asai, K., Okamura, A., Naito, H., Ueyama, J., Saito, I., Nakajima, T., Goto, M., Shibata, E., Kondo, T., Takagi, K., Takagi, K., and Wakusawa,

- S. (2007). Biological monitoring of pyrethroid exposure of pest control workers in Japan. *Journal of Occupational Health* **49**, 509-514.
- Wang, H., Wang, S. F., Ning, H., Ji, Y. L., Zhang, C., Zhang, Y., Yu, T., Ma, X. H., Zhao, X. F., Wang, Q., Liu, P., Meng, X. H., and Xu, D. X. (2011). Maternal Cypermethrin Exposure During Lactation Impairs Testicular Development and Spermatogenesis in Male Mouse Offspring. *Environmental Toxicology* **26**, 382-394.
- Wason, S. C., Julien, R., Perry, M. J., Smith, T. J., and Levy, J. I. (2013). Modeling exposures to organophosphates and pyrethroids for children living in an urban low-income environment. *Environmental Research* **124**, 13-22.
- Wason, S. C., Smith, T. J., Perry, M. J., and Levy, J. I. (2012). Using Physiologically-Based Pharmacokinetic Models to Incorporate Chemical and Non-Chemical Stressors into Cumulative Risk Assessment: A Case Study of Pesticide Exposures. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **9**, 1971-1983.
- Watanabe, K. H., and Bois, F. Y. (1996). Interspecies extrapolation of physiological pharmacokinetic parameter distributions. *Risk analysis : an official publication of the Society for Risk Analysis* **16**, 741-54.
- Watanabe, T., Kusuhara, H., and Sugiyama, Y. (2010). Application of physiologically based pharmacokinetic modeling and clearance concept to drugs showing transporter-mediated distribution and clearance in humans. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics* **37**, 575-590.
- Wei, B., Isukapalli, S. S., and Weisel, C. P. (2013). Studying permethrin exposure in flight attendants using a physiologically based pharmacokinetic model. *Journal of Exposure Science Environmental Epidemiology*.
- Weisglas-Kuperus, N., Patandin, S., Berbers, G. A. M., Sas, T. C. J., Mulder, P. G. H., Sauer, P. J. J., and Hooijkaas, H. (2000). Immunologic effects of background exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins in Dutch preschool children. *Environmental Health Perspectives* **108**, 1203-1207.
- Welsch, F., Blumenthal, G. M., and Conolly, R. B. (1995). Physiologically based pharmacokinetic models applicable to organogenesis: Extrapolation between species and potential use in prenatal toxicity risk assessments. *Toxicology Letters* **82-3**, 539-547.
- Wessel, M. D., Jurs, P. C., Tolan, J. W., and Muskal, S. M. (1998). Prediction of human intestinal absorption of drug compounds from molecular structure. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* **38**, 726-735.
- Wilkinson, G. R. (1987). Clearance Approaches in Pharmacology. *Pharmacological Reviews* **39**, 1-47.
- Wolansky, M. J., and Harrill, J. A. (2008). Neurobehavioral toxicology of pyrethroid insecticides in adult animals: A critical review. *Neurotoxicology and Teratology* **30**, 55-78.
- Woollen, B. H., Marsh, J. R., Laird, W. J. D., and Lesser, J. E. (1992). The metabolism of cypermethrin in man: differences in urinary metabolite profiles following oral and dermal administration. *Xenobiotica* **22**, 983-991.
- Yang, D., Pearce, R. E., Wang, X., Gaedigk, R., Wan, Y.-J. Y., and Yan, B. (2009). Human carboxylesterases HCE1 and HCE2: Ontogenic expression, inter-individual variability and differential hydrolysis of oseltamivir, aspirin, deltamethrin and permethrin. *Biochemical Pharmacology* **77**, 238-247.
- Yang, P. Y., Lin, J. L., Hall, A. H., Tsao, T. C., and Chern, M. S. (2002). Acute ingestion poisoning with insecticide formulations containing the pyrethroid permethrin, xylene, and surfactant: a review of 48 cases. *Journal of Toxicology - Clinical Toxicology* **40**, 107-13.
- Yoon, M., Campbell, J. L., Andersen, M. E., and Clewell, H. J. (2012). Quantitative in vitro to in vivo extrapolation of cell-based toxicity assay results. *Critical Reviews in Toxicology* **42**, 633-652.
- Young, H. A., Meeker, J. D., Martenies, S. E., Figueroa, Z. I., Barr, D. B., and Perry, M. J. (2013). Environmental exposure to pyrethroids and sperm sex chromosome disomy: a cross-sectional study. *Environmental Health* **12**.

- Yu, L. X., and Amidon, G. L. (1998). Saturable small intestinal drug absorption in humans: modeling and interpretation of cefatrizine data. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **45**, 199-203.
- Yu, L. X., and Amidon, G. L. (1999). A compartmental absorption and transit model for estimating oral drug absorption. *International Journal of Pharmaceutics* **186**, 119-125.
- Yu, L. X., Lipka, E., Crison, J. R., and Amidon, G. L. (1996). Transport approaches to the biopharmaceutical design of oral drug delivery systems: prediction of intestinal absorption. *Advanced Drug Delivery Reviews* **19**, 359-376.
- Yuan, R., Madani, S., Wei, X. X., Reynolds, K., and Huang, S. M. (2002). Evaluation of cytochrome P450 probe substrates commonly used by the pharmaceutical industry to study in vitro drug interactions. *Drug Metabolism and Disposition* **30**, 1311-1319.
- Zartarian, V., Xue, J., Glen, G., Smith, L., Tolve, N., and Tornero-Velez, R. (2012). Quantifying children's aggregate (dietary and residential) exposure and dose to permethrin: application and evaluation of EPA's probabilistic SHEDS-Multimedia model. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology* **22**, 267-273.
- Zhang, C., Zhao, Z., Rahim, N. A. A., van Noort, D., and Yu, H. (2009). Towards a human-on-chip: Culturing multiple cell types on a chip with compartmentalized microenvironments. *Lab on a Chip* **9**, 3185-3192.
- Zhang, S.-Y., Ueyama, J., Ito, Y., Yanagiba, Y., Okamura, A., Kamijima, M., and Nakajima, T. (2008). Permethrin may induce adult male mouse reproductive toxicity due to cis isomer not trans isomer. *Toxicology* **248**, 136-141.
- Zhang, S. Y., Ito, Y., Yamanoshita, O., Yanagiba, Y., Kobayashi, M., Taya, K., Li, C., Okamura, A., Miyata, M., Ueyama, J., Lee, C. H., Kamijima, M., and Nakajima, T. (2007). Permethrin may disrupt testosterone biosynthesis via mitochondrial membrane damage of leydig cells in adult male mouse. *Endocrinology* **148**, 3941-3949.
- Zhang, W., Jiang, F., and Ou, J. (2011). Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, **1**, 125-144.
- Zhang, Z. W., Sun, J. X., Chen, S. Y., Wu, Y. Q., and He, F. S. (1991). Levels of Exposure and Biological Monitoring of Pyrethroids in Spraymen. *British Journal of Industrial Medicine* **48**, 82-86.

Annexes

ANNEXES

Annexe A. Equations du modèle PBPK perméthrine et de ses métabolites chez le rat

Symbols

Compartment abbreviations:

blo	blood
bra	brain
fat	fat
gi	Gastro-intestinal tract
kid	kidney
liv	liver
mus	muscle
tes	testes
sp	slowly perfused tissue
rp	rapidly perfused tissue
rb	rest of body

Primary symbols:

A_{abs}	amount of absorbed <i>cis</i> - or <i>trans</i> -permethrin (mg)
A_{cent}	amount in the central compartment (mg)
A_{int}	amount of <i>cis</i> - or <i>trans</i> -permethrin in the intestinal lumen (mg)
A_{sto}	amount of <i>cis</i> - or <i>trans</i> -permethrin in the stomach (mg)
A_T	amount in the tissue (mg)
$A_{T_{blo}}$	amount in the extracellular space of the tissue (mg)
$A_{T_{ti}}$	amount in the intracellular space of the tissue (mg)
V_T	volume of the tissue (L)
C_{blo}	concentration of compound in arterial blood (mg/L)
C_v	venous concentration (mg/mL)
C_{out_T}	concentration in venous blood leaving tissue (mg/L)
K_{blo}	metabolism clearance in blood (L/h)
K_{gi}	metabolism clearance in GI tract (L/h)
K_{liv}	metabolism clearance in liver (L/h)
$Frac_{metX}$	Fraction of the clearance of permethrin
K_{si}	stomach-intestine transfer constant (h^{-1})
K_{sto}	stomach absorption constant (h^{-1})
K_{int}	intestinal absorption constant (h^{-1})
K_{fec}	fecal constant (h^{-1})
K_{uri}	urinary constant (L/h for DCCA and h^{-1} for 3-PBA and 4'-OH-PBA)
Q_T	blood flow of the tissue (L/h)
PC_T	tissue/blood partition coefficient of the tissue
PA_T	permeability coefficient of the tissue (L/h)
BV	blood volume fraction

Equations of the PBPK model**1. Common equations****Tissue distribution**

- **Flow limited compartment**

Liver, kidney, GI tract and rapidly perfused tissues are modeled as flow limited compartments.

$$\frac{dA_T}{dt} = Q_T \times (C_{blo} - C_{out_T}) \quad (A1)$$

Where the concentration in venous blood at the tissue exist is described as

$$C_{out_T} = \frac{C_T}{PC_T} \quad (A2)$$

C_T is the concentration of the compound in the tissue, computed as the ratio of the amount Q_T on the volume of the tissue V_T .

- **Diffusion limited compartment**

Brain, fat, testes, muscle, slowly perfused tissues for permethrin and rest of body compartment for DCCA are modeled as diffusion limited compartments where the distribution of the compound in the organ is limited by the permeability coefficient PA_T , dividing the tissue in two spaces: intracellular (tissue) and extracellular (blood) tissue spaces.

- Rate in extracellular tissue space

$$\frac{dA_{T_{blo}}}{dt} = Q_T \times (C_{blo} - C_{T_{blo}}) + PA_T \times (C_{out_{T_i}} - C_{T_{blo}}) \quad (A3)$$

- Rate in intracellular tissue space

$$\frac{dA_{T_i}}{dt} = PA_T \times (C_{T_{blo}} - C_{out_{T_i}}) \quad (A4)$$

Where the concentration in the intracellular space is defined as

$$C_{T_i} = \frac{A_{T_i}}{(1 - BV_T) \times V_T} \quad (A5)$$

And the concentration in venous blood at the tissue exist is described as

$$C_{out_{T_i}} = \frac{C_{T_i}}{PC_T} \quad (A6)$$

2. Specific equations for cis- and trans-permethrin

Oral absorption

Absorption of *cis*- or *trans*-permethrin occurs in the intestinal lumen.

$$\frac{dA_{abs}}{dt} = K_{int} \times A_{int} \quad (A7)$$

Kinetic of the parent compound in the intestinal lumen is described as followed

$$\frac{dA_{int}}{dt} = K_{si} \times A_{sto} - K_{int} \times A_{int} - K_{fec} \times A_{int} \quad (A8)$$

Once absorbed, the rate of change of the compound in the gastro-intestinal tract is described as

$$\frac{dA_{gi}}{dt} = Q_{gi} \times (C_{blo} - C_{out_{gi}}) + \frac{dA_{abs}}{dt} - R_{gi} \quad (A9)$$

Where R_{gi} stands for the metabolism of permethrin in the GI tract

$$R_{gi} = K_{gi} \times C_{out_{gi}} \quad (A10)$$

Blood compartment

Blood is represented as a compartment since metabolism of permethrin occurs due to CEs.

$$\frac{dA_{blo}}{dt} = Q_{tot} \times (C_v - C_{blo}) - R_{blo} \quad (A11)$$

Where the venous concentration in permethrin is defined as

$$C_v = \frac{\sum Q_T \times C_{out_T} + \sum Q_T \times C_{T_{blo}}}{Q_{tot}} \quad (A12)$$

The metabolism due to enzymes in blood is determined as

$$R_{blo} = K_{blo} \times C_{blo} \quad (A13)$$

Hepatic metabolism

The rate of change in the liver is described as

$$\frac{dA_{liv}}{dt} = Q_{liv_a} \times C_{blo} + Q_{gi} \times C_{out_{gi}} - Q_{liv_out} \times C_{out_{liv}} - R_{liv} \quad (A14)$$

Where the hepatic metabolism is described as:

$$R_{liv} = K_{liv} \times C_{out_{liv}} \quad (A15)$$

Total metabolism

The total metabolism of permethrin is equal as the sum of the GI, hepatic and blood metabolisms of *cis*- or *trans*-permethrin.

$$R_{tot_PER} = R_{gi_PER} + R_{blo_PER} + R_{liv_PER} \quad (A16)$$

3. Equations for metabolites DCCA, 3-PBA and 4'-OH-PBA

Formation

The rate of formation of metabolites DCCA, 3-PBA or 4'-OH-PBA (symbolized by X) is estimated as a fraction ($Frac_{met_X}$) of the sum of the GI, hepatic and blood clearances of permethrin. The parent concentration is expressed in mg/L so the rate of formation was multiplied by the ratio of molecular weight of the metabolite and of the parent compound.

$$\frac{dA_{met_X}}{dt} = Frac_{met_X} \times (R_{gi_PER} + R_{blo_PER} + R_{liv_PER}) \times \frac{MW_X}{MW_{PER}} \quad (A17)$$

Model of DCCA

Kinetic of DCCA was modeled by blood, liver and rest of body.

Rate of change of DCCA in blood is described as

$$\frac{dA_{blo_DCCA}}{dt} = Q_{tot} \times (Cv_DCCA - C_{blo_DCCA}) - R_{uri_DCCA} \quad (A18)$$

Where the rate of elimination of DCCA to urine is computed as

$$R_{uri_DCCA} = K_{uri_DCCA} \times C_{blo_DCCA} \quad (A19)$$

Venous concentration in DCCA is computed in the same way as venous concentration in permethrin (Equation 12).

Kinetic in liver is modeled as flow limited compartment

$$\frac{dA_{liv_DCCA}}{dt} = Q_{liv_out} \times (C_{blo_DCCA} - C_{out_liv_DCCA}) + R_{met_DCCA} - R_{fec_DCCA} \quad (A20)$$

Where the elimination of DCCA in feces is computed as

$$R_{fec_DCCA} = K_{fec_DCCA} \times A_{liv_DCCA} \quad (A21)$$

Rest of body compartment for DCCA is described as diffusion limited compartment (Equations A3 and A4).

3-PBA and 4'-OH-PBA kinetic description

A reduced model was used to describe kinetic of 3-PBA and 4'-OH-PBA (symbolized by X). The rate of change in the central compartment was described as

$$\frac{dA_{cent_X}}{dt} = R_{met_X} - R_{uri_X} \quad (A22)$$

Where the elimination of the metabolite in urine was defined as

$$R_{uri_X} = K_{uri_X} \times A_{cent_X} \quad (A23)$$

Annexe B. Epreuves auteur « La modélisation toxico-pharmacocinétique à fondement physiologique : son rôle en évaluation du risque et en pharmacologie ».

[Chapitre YY]

La modélisation toxico-pharmacocinétique à fondement physiologique : son rôle en évaluation du risque et en pharmacologie

Céline BROCHOT, Marie-Émilie WILLEMIN & Florence ZEMAN

Les effets bénéfiques ou indésirables relatifs à l'exposition à une substance ne sont pas uniquement liés à la dose externe reçue mais dépendent de la quantité de produit actif atteignant les cellules cibles. Ainsi deux phases se distinguent : le cheminement de la substance dans l'organisme jusqu'aux tissus cibles (la pharmacocinétique) et l'action de la substance au niveau des tissus cibles (la pharmacodynamie). Schématiquement, la pharmacocinétique (ou toxicocinétique pour les substances chimiques) peut être définie par l'action de la substance sur l'organisme, et la pharmacodynamie par l'action de la substance sur l'organisme. Afin de comprendre et contrôler les effets des xénobiotiques thérapeutiques ou toxiques, il est donc essentiel de caractériser leur pharmacocinétique.

De par la complexité des processus mis en jeu, la relation liant la dose efficace dans les tissus cibles à celle d'exposition n'est pas forcément linéaire. La modélisation pharmacocinétique permet de mettre en équations les processus d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'excrétion (processus ADME). Parmi les modèles pharmacocinétiques, les modèles à fondement physiologique, appelés aussi PBPK pour *Physiologically Based Pharmacokinetic*, décrivent les processus ADME en se basant sur des considérations anatomiques, physiologiques, biochimiques et physicochimiques. Un modèle PBPK subdivise l'organisme en compartiments représentant des tissus ou organes et les relie entre eux par l'intermédiaire d'un fluide circulant, le plus souvent le sang. Les paramètres du modèle correspondent à

des entités physiologiques et biochimiques spécifiques à l'organisme et à la substance étudiés, telles que les volumes des organes, les flux sanguins tissulaires, les affinités de la substance pour les tissus ou encore les vitesses de métabolisme. À la fin des années 1930, Torsten Teorell¹ fut un des premiers à conceptualiser la modélisation pharmacocinétique mécanistique basée sur les transferts de masse entre organes/compartiments. Cependant, en l'absence d'outils d'intégration adéquats, Teorell dut simplifier son modèle pour ne garder qu'un ou deux compartiments, perdant ainsi toute signification physiologique. La modélisation PBPK dut attendre l'avènement de calculateurs puissants pour poursuivre son développement. Aujourd'hui la modélisation PBPK a su s'intégrer dans les méthodologies d'évaluation du risque toxicologique pour améliorer la caractérisation des relations dose-réponse², mais aussi dans l'industrie pharmaceutique lors du développement de nouvelles substances thérapeutiques³. Dans ce chapitre, nous présentons les différentes étapes de construction d'un modèle PBPK et ensuite faisons le point sur l'application de ces modèles en toxicologie et en pharmacologie.

1] Construction d'un modèle PBPK

Face au nombre croissant de modèles PBPK publiés, des règles de bonnes pratiques ont fait l'objet de plusieurs publications afin de promouvoir un cadre de développement commun aux modèles PBPK et ainsi accroître la confiance d'utilisateurs potentiels⁴. Plusieurs étapes ont ainsi été définies. Tout d'abord, la structure du modèle est déter-

[1] Torsten Teorell, « Kinetics of distribution of substances administered to the body », *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie*, 57, 1937, p. 205-240.

[2] Environmental Protection Agency (US EPA), *Approaches for the Application of Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Models and Supporting Data in Risk Assessment* (Final Report), Washington D.C., EPA/600/R-05/043F, 2006 @ ; International Programme on Chemical Safety (IPCS), *Characterization and application of physiologically based pharmacokinetic models in risk assessment*, Geneva, Switzerland, World Health Organization, 2010 @.

[3] Sheila A. Peters, *Physiologically-Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling and Simulations: Principles, Methods, and Applications in the Pharmaceutical Industry*, Hoboken, John Wiley & Sons Inc., 2012, p. 448.

[4] George Loizou *et al.*, « Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: The first steps », *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 50(3), 2008, p. 400-411 @ ; Eva D. McLanahan *et*

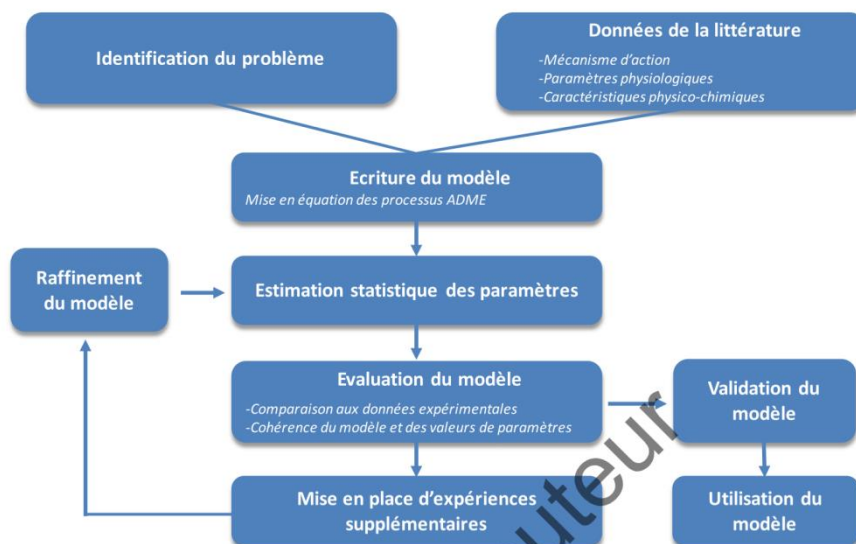


FIGURE 1. Les différentes étapes de construction et de développement d'un modèle PBPK.

minée en se basant sur la physiologie de l'espèce considérée, ainsi que sur les caractéristiques physico-chimiques de la molécule d'intérêt et de son mode d'action. Une fois la structure établie, les valeurs des paramètres physiologiques et spécifiques de la molécule doivent être renseignées afin de pouvoir réaliser des simulations. Enfin, le modèle défini et paramétré est implémenté dans un logiciel. Il est ensuite évalué afin de vérifier son aptitude à reproduire des données expérimentales observées. La figure 1 résume ces différentes étapes, présentées dans la suite.

1.1] Structure d'un modèle PBPK

Un modèle PBPK a pour objectif de décrire de manière plus ou moins détaillée le devenir d'une substance dans un organisme vivant. La structure d'un modèle PBPK repose sur l'anatomie et la physiologie de cet organisme mais aussi sur les interactions entre les tissus et la substance. Dans la majorité des cas, il n'est pas nécessaire de décrire de manière exhaustive l'ensemble des tissus et organes compo-

al., « Physiologically Based Pharmacokinetic Model Use in Risk Assessment-Why Being Published Is Not Enough », *Toxicological Sciences*, 126(1), 2012, p. 5-15 @.

sant l'organisme et seuls les organes ou tissus étant nécessaires à la description des processus ADME sont inclus. En particulier sont toujours présents : les voies d'entrée ou d'absorption (par exemple, le tractus gastro-intestinal, les poumons ou la peau) ; les organes cibles c'est-à-dire là où l'action toxique ou thérapeutique a lieu ; les sites de métabolisme (par exemple, le foie, les intestins ou les poumons) ; les sites de stockage (par exemple, les tissus adipeux ou les os) ; les voies d'élimination ; les tissus ou fluides pour lesquels des données expérimentales ont été observées ; un fluide permettant de lier les différents compartiments entre eux (généralement, le sang).

Certains tissus non essentiels à la description des processus ADME peuvent être regroupés selon leur affinité pour le composé et leur degré de perfusion⁵. Généralement, ces tissus sont agrégés en deux compartiments qualifiés de « faiblement perfusés » (par exemple, les muscles et la peau) et de « rapidement perfusés » (les viscères). D'autres méthodes d'agrégation basées uniquement sur la structure mathématique du modèle ont aussi été appliquées aux modèles PBPK⁶. Un exemple de modèle PBPK générique est présenté **figure 2**.

Deux dernières composantes importantes à prendre en compte lors de la construction d'un modèle PBPK sont : i) la question à laquelle l'exercice de modélisation doit répondre et ii) les données expérimentales disponibles au moment de l'étude pour l'évaluation du modèle. En fonction de ce questionnement et des données, différentes structures de modèle PBPK peuvent être proposées pour le même composé chez une même espèce⁷. Les différences entre les modèles pour une

[5] Ivan A. Nestorov *et al.*, « Lumping of whole-body physiologically based pharmacokinetic models », *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 26, 1998, p. 21-46 @.

[6] Céline Brochot, Janos Toth & Frédéric Y. Bois, « Lumping in pharmacokinetics », *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, 32(5-6), 2005, p. 719-736 @ ; Aristides Dokoumetzidis & Leon Arons, « A method for robust model order reduction in pharmacokinetics », *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, 36(6), 2009, p. 613-628 @.

[7] Michael C. Kohn & Ronald L. Melnick, « Species differences in the production and clearance of 1,3-butadiene metabolites : a mechanistic model indicates predominantly physiological, not biochemical, control », *Carcinogenesis*, 14, 1993, p. 619-628 @ ; Céline Brochot, Thomas J. Smith & Frédéric Y. Bois, « Development of a physiologically based toxicokinetic model for butadiene and four major metabolites in humans : Global sensitivity analysis for experimental design issues », *Chemico-Biological Interactions*, 167(3), 2007, p. 168-183 @.

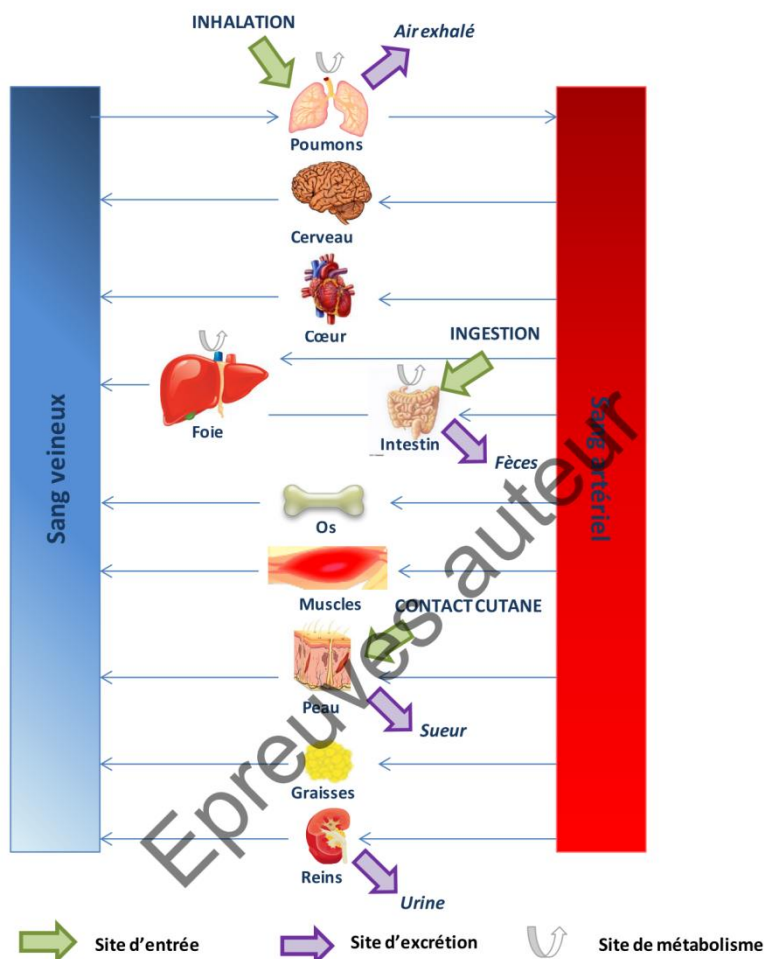


FIGURE 2. Description d'un modèle PBPK générique avec différents sites d'administration, d'excrétion et de métabolisme.

même molécule se situent généralement au niveau de la description de l'anatomie (nombre de compartiments), ce qui peut par la suite affecter le nombre de sites de métabolisme ou de stockage en fonction de l'agrégation de certains tissus.

Un modèle PBPK comporte donc rarement une description exhaustive de l'organisme. La raison principale reste la difficulté d'obtenir des informations précises pour le paramétrer. Plus le modélisateur

souhaite décrire de façon détaillée les processus ADME au sein de chaque tissu ou organe, plus la complexité du modèle augmente. Cette complexité se traduit par un nombre important de paramètres à identifier et donc une augmentation du nombre de données nécessaires à l'évaluation du modèle. C'est pourquoi un équilibre doit être généralement obtenu entre le réalisme biologique et physiologique et la parcimonie⁸.

1.2] Mise en équations des processus ADME

L'ensemble des processus ADME subis par la molécule est transcrit sous la forme d'équations différentielles. Dans la majorité des modèles PBPK, les échanges entre les différents compartiments sont basés sur le transfert de masse *via* la circulation sanguine.

Absorption

L'absorption correspond à l'introduction du composé dans l'organisme à partir du site d'administration jusqu'à la circulation sanguine. L'absorption s'effectue par différentes voies : l'inhalation (voie pulmonaire), le contact cutané, l'ingestion (voie orale) ou l'injection par intraveineuse. Un ensemble de mécanismes complexes régit le passage de la substance entre le site d'administration et la circulation sanguine, que seule une fraction atteindra (à l'exception de l'injection par intraveineuse qui introduit directement le composé dans la circulation sanguine). La quantité de molécules absorbée dépend de la dose, de la voie d'administration, de la durée d'exposition, des propriétés physico-chimiques de la molécule (solubilité, vitesse de dissolution) et de la nature du transport emprunté par la molécule à travers les membranes cellulaires. Pour chaque voie d'exposition, la modélisation de ces mécanismes repose sur un nombre limité de paramètres spécifiques à la substance et sur la description physiologique des sites d'administration. Selon le type de molécules et des données existantes, plusieurs modèles sont disponibles pour chaque voie d'administration avec des niveaux de détails différents. Des modèles d'absorption pour les voies orale et pulmonaire sont présentés ci-après.

Le modèle d'absorption orale le plus simplifié suppose le passage du composé de l'intestin vers la circulation porte hépatique selon une

[8] Rebecca A. Clewell & Harvey J. Clewell, «Development and specification of physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment», *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 50(1), 2008, p. 129-143 @.

réaction d'ordre 1. Cette représentation considère que le tractus gastro-intestinal est un compartiment homogène et que la totalité du composé administré rejoint la circulation systémique. Ce modèle n'est toutefois pas valable pour de nombreuses molécules et une description plus fine du tractus gastro-intestinal et des interactions entre ce dernier et la molécule peut être requise⁹. Ainsi le modèle CAT (*Compartmental Absorption and Transit*), développé pour des composés se dissolvant immédiatement dans l'estomac¹⁰, propose de diviser le tractus gastro-intestinal en trois segments représentant l'estomac, l'intestin grêle et le côlon. L'intestin grêle est lui-même subdivisé en sept compartiments ayant une signification physiologique (par exemple, le duodénum, le jéjunum ou l'iléon) reliés par des constantes de transfert. La molécule est introduite dans l'estomac, ensuite elle se distribue dans l'intestin grêle où elle peut être absorbée et ainsi rejoindre la circulation sanguine, et elle peut être excrétée *via* le colon par les fèces. Des ajouts au modèle CAT ont permis de prendre en compte la vitesse de dissolution du composé (par exemple pour les médicaments à libération modifiée) et d'identifier les causes d'une faible absorption en déterminant la fraction disponible, ou encore en rendant possible la saturation de l'absorption¹¹. D'autres modèles basés sur le modèle CAT ont ensuite été développés, comme les modèles ACAT (*Advanced CAT*) et ADAM (*Advanced Dissolution, Absorption, Metabolism*). Les ajouts majeurs du modèle ACAT consistent en la description de six états de la molécule rendant compte des facteurs physico-chimiques de la molécule (pK_a , solubilité, perméabilité) et des facteurs physiologiques (vidange gastrique, transport et métabolisme intestinal) pour décrire les transferts entre compartiments et les interactions de la molécule avec les tissus intestinaux¹². Quant au modèle ADAM, il permet d'individua-

[9] Weili Huang, Sau L. Lee & Lawrence X. Yu, « Mechanistic Approaches to Predicting Oral Drug Absorption », *The AAPS Journal*, 11(2), 2009, p. 217-224 @.

[10] Lawrence X. Yu *et al.*, « Transport approaches to the biopharmaceutical design of oral drug delivery systems: prediction of intestinal absorption », *Advanced Drug Delivery Reviews*, 19(3), 1996, p. 359-376 @.

[11] Lawrence X. Yu & Gordon L. Amidon, « Saturable small intestinal drug absorption in humans: modeling and interpretation of cefatrizine data », *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 45(2), 1998, p. 199-203 @ ; « A compartmental absorption and transit model for estimating oral drug absorption », *International Journal of Pharmaceutics*, 186(2), 1999, p. 119-125 @.

[12] Balaji Agoram *et al.*, « Predicting the impact of physiological and biochemical processes

liser chaque segment de l'intestin en précisant leurs flux sanguins et l'activité du métabolisme et du transport¹³.

La modélisation de la voie pulmonaire consiste, quant à elle, à représenter les échanges entre l'alvéole pulmonaire, site d'entrée et d'excrétion du composé, et le capillaire sanguin, lieu d'absorption du composé (figure 3). En supposant un flux d'air constant dans les poumons et un équilibre rapide entre l'air et le sang alvéolaire, la concentration sanguine artérielle est donnée par¹⁴:

$$C_{art} = \frac{F_{pul} \times C_{inh} + F_{card} \times C_{ven}}{F_{card} + F_{pul} / PC_{S:A}} \quad (1)$$

où C_{art} , C_{ven} et C_{inh} correspondent respectivement à la concentration de la substance dans le sang artériel, veineux et dans l'air inhalé. F_{card} et F_{pul} sont respectivement les flux sanguins cardiaque et pulmonaire, et $PC_{S:A}$ le coefficient de partage du composé entre le sang et l'air. Pour déterminer la concentration exhalée (C_{exh}), il est nécessaire d'ajuster la concentration dans l'espace alvéolaire ($C_{alv} = C_{art} / PC_{S:A}$) à la concentration de substance dans l'espace mort des poumons (où il n'y a pas d'échanges gazeux):

$$C_{exh} = F_{DS} \times C_{inh} + (1 - F_{DS}) \times C_{alv} \quad (2)$$

où F_{DS} est la fraction d'espace mort dans les poumons. Cette description des échanges gazeux est notamment utilisée pour les composés organiques volatils¹⁵.

Distribution

La distribution correspond à la répartition de la molécule dans les différents organes du corps. La molécule, présente dans la circulation

on oral drug bioavailability», *Advanced Drug Delivery Reviews*, 50, Supplement 1(0), 2001, p. S41-S67 @; Edwin C.Y. Chow & K. Sandy Pang, «Why We Need Proper PBPK Models to Examine Intestine and Liver Oral Drug Absorption», *Current Drug Metabolism*, 14(1), 2013, p. 57-79 @.

[13] A.S. Darwich *et al.*, «Interplay of Metabolism and Transport in Determining Oral Drug Absorption and Gut Wall Metabolism: A Simulation Assessment Using the "Advanced Dissolution, Absorption, Metabolism (ADAM)" Model», *Current Drug Metabolism*, 11(9), 2010, p. 716-729 @.

[14] John C. Ramsey & Melvin E. Andersen, «A physiologically based description of the inhalation pharmacokinetics of styrene in rats and humans», *Toxicology and Applied Pharmacology*, 73(1), 1984, p. 159-175 @.

[15] Micaela B. Reddy *et al.*, *Physiologically based pharmacokinetic modelling: science and applications*, Hoboken, John Wiley & Sons, 2005, p. 420.

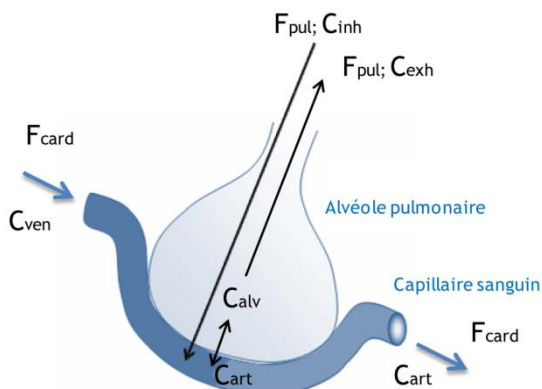


FIGURE 3. Représentation des échanges alvéolaires entre le sang et l'air. Les paramètres F_{card} , F_{alv} et F_{pul} sont respectivement les flux sanguins cardiaque, alvéolaire et pulmonaire. C_{alv} , C_{art} , C_{ven} , C_{inh} et C_{exh} correspondent respectivement à la concentration dans le sang alvéolaire, artériel et veineux et dans l'air inhalé et exhalé.

sanguine, passe du sang vers les organes selon son affinité pour ces derniers. Le processus de distribution dépend de plusieurs facteurs : l'état d'ionisation de la molécule, son caractère lipophile, mais aussi la composition des organes, la perméabilité des membranes tissulaires ou encore la perfusion des tissus. La distribution est caractérisée par le coefficient de partage tissu sur sang ($PC_{T,S}$) défini comme le rapport de la concentration de la substance dans le tissu, C_T , sur celle du sang veineux, C_{ven} , lorsque les deux milieux sont à l'équilibre¹⁶.

La distribution d'une molécule au sein d'un tissu peut être limitée par la perfusion de ce tissu ou bien par la perméabilité tissulaire¹⁷. Selon la nature de la distribution, les équations régissant l'évolution de la quantité de molécule au sein du tissu diffèrent. Lors d'une distribution limitée par la perfusion, la molécule est supposée se distribuer uniformément et instantanément dans le volume total du tissu. Sont concernées principalement les molécules de faibles poids moléculaires, lipophiles ou possédant un transport de type diffusion passive ou facilitée. Ce transport bidirectionnel laisse diffuser les molécules selon la loi de Fick¹⁸. Ainsi, dans un tissu sans processus

[16] Malcolm Rowland, « Physiological Pharmacokinetic Models and Interanimal Species Scaling », *Pharmacology & Therapeutics*, 29(1), 1985, p. 49-68 @.

[17] Leonard E. Gerlowski & Rakesh K. Jain, « Physiologically based pharmacokinetic modeling : principles and applications », *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 72, 1983, p. 1103-1127 @.

[18] Kiyohiko Sugano *et al.*, « Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport », *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(8), 2010, p. 597-614 @.

d'absorption ou d'élimination, l'évolution de la quantité Q_T dans le tissu est donnée par :

$$\frac{dQ_T(t)}{dt} = F_T \times \left(C_{art}(t) - \frac{C_T(t)}{PC_{T:S}} \right) \quad (3)$$

avec C_{art} la concentration dans le sang artériel, C_T la concentration dans le tissu, F_T le flux sanguin et $PC_{T:S}$ le coefficient de partage tissu sur sang. Dans le cas d'une limitation par la diffusion, la distribution de la molécule est dépendante de la perméabilité de l'organe. Sont souvent concernés le cerveau, les graisses ou encore la peau¹⁹. Afin de retranscrire la lenteur du processus, l'organe est subdivisé en deux sous-compartiments : l'espace extracellulaire correspondant à la vascularisation du tissu et l'espace intracellulaire. La surface d'échange entre les deux compartiments est représentée par le coefficient de perméabilité PA_T (dont l'unité est volume/temps/poids de tissu). Les quantités dans l'espace vasculaire et le tissu sont respectivement :

$$\begin{aligned} \frac{dQ_{SgT}(t)}{dt} &= F_t \times (C_{art}(t) - C_{SgT}(t)) - PA_T \times \left(C_{SgT}(t) - \frac{C_T(t)}{PC_{T:S}} \right) \\ \frac{dQ_T(t)}{dt} &= PA_T \times \left(C_{SgT}(t) - \frac{C_T(t)}{PC_{T:S}} \right) \end{aligned} \quad (4)$$

où Q_{SgT} et C_{SgT} sont respectivement la quantité et la concentration de la substance dans l'espace vasculaire. Les deux modèles de distribution sont représentés figure 4.

Enfin, il arrive qu'aucune de ces deux représentations ne parvienne à représenter correctement la cinétique de distribution du composé. L'inclusion du mécanisme de transport de la molécule peut alors être envisagée, en particulier si ce dernier est de type actif²⁰. En effet, les

[19] James N. McDougal *et al.*, « A Physiological Pharmacokinetic Model for Dermal Absorption of Vapors in the Rat », *Toxicology and Applied Pharmacology*, 85(2), 1986, p. 286-294 ; Stephen J. Godin *et al.*, « Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling of Deltamethrin : Development of a Rat and Human Diffusion-Limited Model », *Toxicological Sciences*, 115(2), 2010, p. 330-343 @.

[20] Takao Watanabe, Hiroyuki Kusuhara & Yuichi Sugiyama, « Application of physiologically based pharmacokinetic modeling and clearance concept to drugs showing transporter-mediated distribution and clearance in humans », *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, 37(6), 2010, p. 575-590 @.

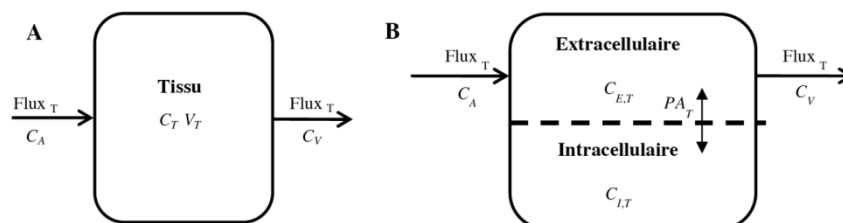


FIGURE 4. Représentation de la distribution du composé dans un organe à perfusion limitée (A) et un organe à diffusion limitée (B). C désigne les concentrations dans, respectivement, l'artère (C_A), le tissu (C_T), la veine (C_V), l'espace extracellulaire ($C_{E,T}$) et intracellulaire ($C_{I,T}$). V_T correspond au volume tissulaire et PA_T au coefficient de perméabilité entre les deux sous-compartiments.

transporteurs actifs présents sur les membranes cellulaires et couplés à une source d'énergie permettent aux molécules (en particulier ionisées et hydrophiles) de traverser les membranes, indépendamment de leurs gradients de concentration. Les transporteurs peuvent être soit d'influx soit d'efflux, c'est-à-dire qu'ils laissent respectivement entrer ou sortir la molécule de la cellule²¹. Ces transporteurs, présents dans la plupart des organes (intestin, foie, rein), peuvent être saturés au-delà d'une certaine concentration en composé, limitant sa distribution²².

Métabolisme

Le métabolisme correspond à la transformation de la molécule parente en un ou plusieurs autre(s) composé(s), appelé(s) métabolite(s). La molécule parente peut être transformée en métabolites actifs (thérapeutiques ou toxiques), dans le cas des promédicaments par exemple, ou bien être détoxifiée lorsqu'elle est déjà active. La réaction métabolique est catalysée par des enzymes, tels que les cytochromes P450 (CYP) pour le métabolisme de phase I ou les sulfotransférases ou glutathion transférases pour le métabolisme de phase II²³. Le

[21] Richard H. Ho & Richard B. Kim, « Transporters and drug therapy: Implications for drug disposition and disease[ast] », *Clin. Pharmacol. Ther.*, 78(3), 2005, p. 260-277 @ ; International Transporter Consortium, « Membrane transporters in drug development », *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(3), 2010, p. 215-236 @.

[22] Kathleen M. Giacomini & Yuichi Sugiyama, « Membrane transporters and drug response », in Laurence L. Brunton *et al.*, *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 12^e ed., McGraw-Hill Professional, 2010, p. 89-122; Sugano *et al.*, *op. cit.*, 2010.

[23] Petra Jancova, Pavel Anzenbacher & Eva Anzenbacherova, « Phase II Drug Metabolizing

métabolisme de phase II permet généralement d'aboutir à la formation de composés conjugués hydrosolubles facilement éliminés *via* les urines ou la bile. En raison de la quantité d'enzymes présente dans les organes, le métabolisme a lieu de manière très importante dans le foie et plus faiblement dans les intestins, les poumons ou les reins²⁴. Le métabolisme aura un impact dès l'ingestion d'une molécule sur sa biodisponibilité, c'est-à-dire sur la fraction qui atteint la circulation systémique, en raison du métabolisme intestinal et du premier passage hépatique, où sont présents transports actifs et enzymes.

Le processus de disparition du composé est caractérisé par la clairance, correspondant à la capacité d'un organe à épurer le sang du composé par unité de temps²⁵. Quand cette capacité est considérée indépendamment des facteurs physiologiques influant sur la clairance globale de l'organe (par exemple, le débit sanguin tissulaire et la fraction libre de substance dans le sang), la clairance est dite intrinsèque. Le métabolisme d'une substance est généralement décrit par un processus d'élimination de premier ordre ou par un processus non linéaire tel que la relation saturable de type Michaelis-Menten²⁶.

Dans le cas d'un processus saturable, la cinétique d'élimination du composé peut être modélisée par la relation de Michaelis-Menten. L'élimination est alors caractérisée par deux paramètres V_{max} et K_m . K_m représente l'affinité entre le substrat et l'enzyme, et V_{max} la vitesse maximale de transformation du substrat²⁷. L'évolution de la quantité de matière au sein de l'organe est alors :

$$\frac{dQ_r(t)}{dt} = F_T \times \left(C_{art}(t) - \frac{C_T(t)}{PC_{T,S}} \right) - \frac{V_{max} \times C_T(t)}{K_m + C_T(t)}$$

Lorsque la concentration en substrat est bien inférieure à celle du K_m (ordre 1), la relation devient linéaire entre la vitesse d'élimination

Enzymes», *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 154(2), 2010, p. 103-116 @.

[24] Pavel Anzenbacher & Eva Anzenbacherova, « Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics », *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58(5-6), 2001, p. 737-747.

[25] Grant R. Wilkinson, « Clearance Approaches in Pharmacology », *Pharmacological Reviews*, 39(1), 1987, p. 1-47 @.

[26] Gerlowski & Jain, *op. cit.*, 1983.

[27] Athel Cornish-Bowden, *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, London, Portland Press Ltd., 2004, p. 422.

et la concentration en substrat et l'équation 5 peut alors être simplifiée en :

$$\frac{dQ_T(t)}{dt} = F_T \times \left(C_{art}(t) - \frac{C_T(t)}{PC_{T:S}} \right) - CL_H \times C_T(t)$$

avec CL_H la clairance de l'organe correspondant au ratio V_{max} sur K_m .

Excrétion

Ce phénomène correspond à l'élimination du composé (molécule parente et/ou métabolites) de l'organisme. Les voies d'élimination peuvent être la voie rénale, fécale, biliaire, pulmonaire, ou s'effectuer par le biais de la sueur ou du lait maternel. Le rein est un des sites majeurs de l'excrétion. Comme pour le métabolisme, une clairance rénale du composé est déterminée, qui permet de lier les concentrations sanguines et urinaires du composé. L'équation 6 est aussi applicable dans ce contexte.

1.3] Paramétrisation des modèles

Une fois la structure du modèle PBPK établie, il est nécessaire d'informer les valeurs des paramètres avant de réaliser des simulations. L'ensemble des paramètres d'un modèle PBPK se compose de paramètres relatifs à l'anatomie de l'individu et aux processus physiologiques sous-jacents (tels que les volumes des organes ou les flux sanguins), de paramètres biochimiques spécifiques de la molécule étudiée et caractéristiques de ses propriétés pharmacocinétiques (tels que les coefficients de partage ou les constantes d'élimination), et de paramètres relatifs à l'exposition, c'est-à-dire la dose et la durée d'exposition, uniquement nécessaires à la conduite de simulations. Parmi ces paramètres, certains sont directement mesurables et donc connus (par exemple, les paramètres relatifs à l'anatomie de l'organisme) et sont donc directement intégrés dans le modèle PBPK. Pour les autres paramètres, le modélisateur a à sa disposition un panel d'approches possibles pour les estimer : la mise en place d'expérimentations *in vitro* dédiées à l'estimation d'un paramètre, l'utilisation de modèles quantitatifs structure-activité (modèle QSAR) ou encore la calibration du modèle PBPK avec des données de cinétique *in vivo*. En pratique, de nombreux critères vont influencer le choix d'une approche. On peut citer des considérations techniques (disponibilité d'une plateforme expérimentale ou faisabilité de développer un modèle QSAR), financières (le coût d'expérimentations est plus élevé que celui de

l'utilisation d'un modèle) ou encore éthiques pour les expérimentations *in vivo*. En termes de prédiction, chaque approche possède ses propres avantages et inconvénients. Par exemple, les données *in vivo* sont intégratrices de la cinétique globale, mais les modèles animaux utilisés peuvent présenter des différences significatives avec l'humain (pas de correspondance pour certains organes, équipement enzymatique différent...), ce qui peut compliquer l'analyse des données ; les modèles QSAR permettent de prédire rapidement et pour un faible coût certains paramètres, mais peu de modèles sont actuellement disponibles pour les paramètres de modèles PBPK en raison de la quantité de données nécessaires à leur développement ; les expérimentations *in vitro* présentent l'avantage d'être réalisables sur des cellules humaines et donc plus représentatives de l'espèce d'intérêt mais elles simplifient la réalité biologique et induisent des interactions entre la substance et le dispositif qui doivent être prises en compte dans l'analyse des données. Le principal critère reste alors le niveau de prédictibilité de l'approche pour le paramètre d'intérêt. Dans la suite, les différentes approches de paramétrisation sont présentées.

Paramètres observables

Les paramètres physiologiques et anatomiques sont, en général, les seuls paramètres directement observables ou mesurables. Ils regroupent entre autres la masse corporelle, les volumes des organes, les flux sanguins, les temps de transits intestinaux, etc. Pour une population humaine, seuls quelques paramètres démographiques, tels que la masse corporelle, la taille, l'âge et le sexe sont usuellement mesurés lors d'une étude. Des relations entre ces paramètres démographiques et les paramètres physiologiques ont été proposées afin de pouvoir tenir compte des variations entre les individus. Ainsi il est possible de calculer les volumes de chacun des organes à partir de la masse, puisque ceux-ci sont référencés en pourcentage de masse corporelle. De même, les flux sanguins de chaque organe sont typiquement exprimés en fonction du débit cardiaque. La majorité des espèces utilisées en toxicologie et pharmacologie ayant fait l'objet de nombreuses études portant sur leur anatomie, ces paramètres sont bien connus et référencés dans la littérature²⁸.

[28] Ronald P. Brown *et al.*, «Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models», *Toxicology and Industrial Health*, 13(4), 1997, p. 407-484 @ ;

Estimation in vitro des paramètres

L'expérimentation *in vitro* offre la possibilité de s'intéresser aux processus ADME de manière sélective afin d'estimer des paramètres des modèles PBPK à partir de tests sur des cellules animales ou humaines (cellules, fractions cellulaires, microcoupes de tissu). Actuellement, le recours aux tests *in vitro* est encouragé et soutenu par les instances réglementaires (directive REACH) en remplacement des tests sur animaux. Les tests *in vitro* peuvent être réalisés au sein d'environnement de culture à l'échelle macroscopique ou microscopique (tels que la boîte de Petri ou les puits de culture cellulaire). Ces environnements sont en général artificiels, mais certains dispositifs expérimentaux récemment développés, tels que les microsystèmes perfusés, permettent une reproduction proche d'un environnement *in vivo*²⁹. Le développement de tests optimisés et de méthodes d'analyse des données générées permet d'obtenir des prédictions fiables pour certains processus ADME. Quelques modèles cellulaires de référence sont présentés ci-dessous.

L'absorption par voie orale (caractérisée par la biodisponibilité et la perméabilité apparente) peut être déterminée sur un système *in vitro* polarisé, composé d'un compartiment donneur (apical) et d'un compartiment récepteur (basolatéral) séparés par une membrane où sont cultivées des cellules Caco-2 (cellules cancéreuses de côlon) ou des cellules MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*)³⁰. La lignée cellulaire Caco-2 est fréquemment utilisée pour prédire l'absorption intestinale de nombreux xenobiotiques, car cette lignée montre des caractéris-

International Commission on Radiological Protection, *Basic Anatomical and Physiological Data for Use in Radiological Protection: Reference Values*, Stockholm, J. Valentin, 2002, p. 265 @.

[29] Jean-Matthieu Prot *et al.*, « A cocktail of metabolic probes demonstrates the relevance of primary human hepatocyte cultures in a microfluidic biochip for pharmaceutical drug screening », *International Journal of Pharmaceutics*, 408(1-2), 2011, p. 67-75 @ ; Chi Zhang *et al.*, « Towards a human-on-chip: Culturing multiple cell types on a chip with compartmentalized microenvironments », *Lab on a Chip*, 9(22), 2009, p. 3185-3192 @.

[30] Hilde Bohets *et al.*, « Strategies for absorption screening in drug discovery and development », *Current topics in medicinal chemistry*, 1(5), 2001, p. 367-83 @ ; Praveen V. Balimane & Saeho Chong, « Cell culture-based models for intestinal permeability: A critique », *Drug Discovery Today*, 10(5), 2005, p. 335-343 @ ; Jennifer D. Irvine *et al.*, « MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells: A tool for membrane permeability screening », *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 88(1), 1999, p. 28-33 @.

tiques morphologiques et fonctionnelles similaires à celles des cellules épithéliales de l'intestin grêle sous des conditions de culture spécifiques. L'absorption cutanée est étudiée dans des systèmes d'exposition similaires avec des peaux natives animales ou humaines, des peaux artificielles ou encore reconstruites³¹.

La caractérisation du métabolisme par des approches non animales se fait préférentiellement par expérimentations *in vitro* en mettant la molécule au contact de cellules ou microsomes hépatiques, intestinaux ou pulmonaires. La déplétion de la molécule ou l'apparition des métabolites est observée afin d'estimer une clairance *in vitro*. Ainsi, peuvent être utilisés des cellules représentant le système global (avec des enzymes de Phase I et II et les transporteurs pour les hépatocytes), des microsomes ou autres fractions subcellulaires et des systèmes recombinants surexprimant les enzymes voulues³². Des facteurs correctifs sont ensuite appliqués à la clairance *in vitro* afin de l'extrapoler *in vivo*³³.

Estimation QSAR des paramètres

Les modèles QSAR regroupent diverses méthodes statistiques de régression ou de classification permettant de corréler la structure chimique d'une molécule à une activité ou propriété physico-chimique. Ces modèles sont basés sur le principe que des molécules ayant des structures chimiques similaires auront des activités ou propriétés similaires. La molécule peut être caractérisée par des descripteurs de sa structure (par exemple, les groupements chimiques identifiés, la structure dans l'espace, etc.) ou par des propriétés physico-chimiques

[31] Carsten Ehrhardt *et al.*, «Models for Skin Absorption and Skin Toxicity Testing», *Drug Absorption Studies*, 2008, p. 3-33 @ ; Frank Netzaff *et al.*, «The human epidermis models EpiSkin (R), SkinEthic (R) and EpiDerm (R): An evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport», *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 60(2), 2005, p. 167-178 @ ; Heike Wagner *et al.*, «Interrelation of permeation and penetration parameters obtained from *in vitro* experiments with human skin and skin equivalents», *Journal of Controlled Release*, 75(3), 2001, p. 283-295 @.

[32] Olavi Pelkonen & Miia Turpeinen, «*In vitro-in vivo* extrapolation of hepatic clearance: Biological tools, scaling factors, model assumptions and correct concentrations», *Xenobiotica*, 37(10-11), 2007, p. 1066-1089 @.

[33] J. Brian Houston, «Relevance of *in vitro* kinetic parameters to *in vivo* metabolism of xenobiotics», *Toxicology in Vitro*, 8(4), 1994, p. 507-512 @ ; Robert J. Riley, Dermot F. McGinnity & Rupert P. Austin, «A unified model for predicting human hepatic, metabolic clearance from *in vitro* intrinsic clearance data in hepatocytes and microsomes», *Drug Metabolism and Disposition*, 33(9), 2005, p. 1304-1311 @.

(par exemple, l'ionisation ou la lipophilie). Un modèle QSAR est développé à partir d'un ensemble de substance pour lesquelles l'activité ou la propriété est connue (par exemple, par expérimentations *in vitro* ou *in vivo*). Ce modèle peut ensuite être utilisé pour prédire cette même activité ou propriété pour une nouvelle substance, à la condition que cette dernière soit incluse dans le domaine de validité du modèle.

Pour paramétrer les modèles PBPK, les modèles QSAR sont utilisés soit pour estimer certaines propriétés physico-chimiques ou soit directement certains paramètres spécifiques des molécules au sein des processus ADME. Par exemple, de nombreux modèles QSAR ont été développés afin de prédire l'affinité des molécules pour les tissus à partir de la lipophilie et de la composition des tissus³⁴, la perméabilité cutanée³⁵, ou encore la biodisponibilité des molécules³⁶. Le développement de modèles QSAR ne rencontre pas autant de succès pour d'autres processus ADME. Par exemple, la qualité des prédictions est moins satisfaisante pour la prédiction de la clairance métabolique pour laquelle les approches *in vitro* et *in vivo* présentent de meilleurs niveaux de prédictibilité³⁷.

Estimation statistique des paramètres

Lorsque des données *in vivo* humaines ou animales sont disponibles, il est possible d'estimer certains paramètres toxicocinétiques

- [34] Stefan Balaz & Viera Lukacova, « A model-based dependence of the human tissue/blood partition coefficients of chemicals on lipophilicity and tissue composition », *Quantitative Structure-Activity Relationships*, 18(4), 1999, p. 361-368 @ ; Patrick Poulin & Frank-Peter Theil, « A priori prediction of tissue: plasma partition coefficients of drugs to facilitate the use of physiologically-based pharmacokinetic models in drug discovery », *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 89(1), 2000, p. 16-35.
- [35] Gary P. Moss *et al.*, « Quantitative structure-permeability relationships (QSPRs) for percutaneous absorption », *Toxicology in Vitro*, 16(3), 2002, p. 299-317 @ ; Jim E. Riviere & James D. Brooks, « Predicting Skin Permeability from Complex Chemical Mixtures: Dependency of Quantitative Structure Permeation Relationships on Biology of Skin Model Used », *Toxicological Sciences*, 119(1), 2011, p. 224-232 @.
- [36] Oleg A. Raevsky *et al.*, « Quantitative estimation of drug absorption in humans for passively transported compounds on the basis of their physico-chemical parameters », *Quantitative Structure-Activity Relationships*, 19(4), 2000, p. 366-374 @ ; Matthew D. Wessel *et al.*, « Prediction of human intestinal absorption of drug compounds from molecular structure », *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 38(4), 1998, p. 726-735 @.
- [37] Thomas Peyret & Kannan Krishnan, « QSARs for PBPK modelling of environmental contaminants », *Sar and Qsar in Environmental Research*, 22(1-2), 2011, p. 129-169 @.

à partir de l'ajustement d'un modèle PBPK à ces données. De nombreux auteurs utilisent une méthode d'estimation visuelle, c'est-à-dire plusieurs valeurs sont choisies par les modélisateurs pour le ou les paramètre(s) inconnu(s) et la valeur menant à une concordance satisfaisante entre la cinétique observée et les prédictions du modèle est retenue³⁸. Cette méthode n'est cependant pas robuste et est souvent biaisée par les choix *a priori* des modélisateurs.

En parallèle de ces méthodes visuelles, la calibration bayésienne de modèles PBPK à l'aide de données de cinétique rencontre un succès certain depuis une vingtaine d'années³⁹. Dans un contexte bayésien, toutes les entités inconnues sont considérées comme des variables aléatoires, notamment les paramètres du modèle (noté θ). Avant d'analyser les données expérimentales, une distribution de probabilité *a priori*, P_θ , est assignée à chaque paramètre à estimer. Les distributions *a priori* sont ensuite mises à jour avec les nouvelles données expérimentales afin d'obtenir une distribution de probabilité *a posteriori*. Cette mise à jour est réalisée par l'intermédiaire du théorème de Bayes qui stipule que la distribution de probabilité *a posteriori* $P(\theta|y)$ est proportionnelle au produit de toutes les distributions *a priori*, P_θ , et de la vraisemblance des données, $P(y|\theta)$:

$$P(\theta|y) \propto P_\theta \times P(y|\theta) \quad (7)$$

La distribution de probabilité *a posteriori* ainsi obtenue représente la connaissance sur les paramètres, incluant l'information contenue dans les nouvelles données. Trois composantes sont donc essentielles à la mise en œuvre d'une calibration bayésienne : la définition des distributions *a priori* et de la vraisemblance, et l'algorithme de mise à jour. La figure 5 présente graphiquement le principe de calibration bayésienne d'un modèle PBPK.

[38] Rogelio Tornero-Velez *et al.*, « A Pharmacokinetic Model of cis- and trans-Permethrin Disposition in Rats and Humans With Aggregate Exposure Application », *Toxicological Sciences*, 130(1), 2012, p. 33-47 @.

[39] Andrew Gelman, Frédéric Y. Bois & J. Jiang, « Physiological pharmacokinetic analysis using population modeling and informative prior distributions », *Journal of the American Statistical Association*, 91(436), 1996, p. 1400-1412 @ ; C. Eric Hack, « Bayesian analysis of physiologically based toxicokinetic and toxicodynamic models », *Toxicology*, 221(2-3), 2006, p. 241-248 @ ; Justin G. Teeguarden *et al.*, « A multi-route model of nicotine-cotinine pharmacokinetics, pharmacodynamics and brain nicotinic acetylcholine receptor binding in humans », *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 65(1), 2013, p. 12-28 @.

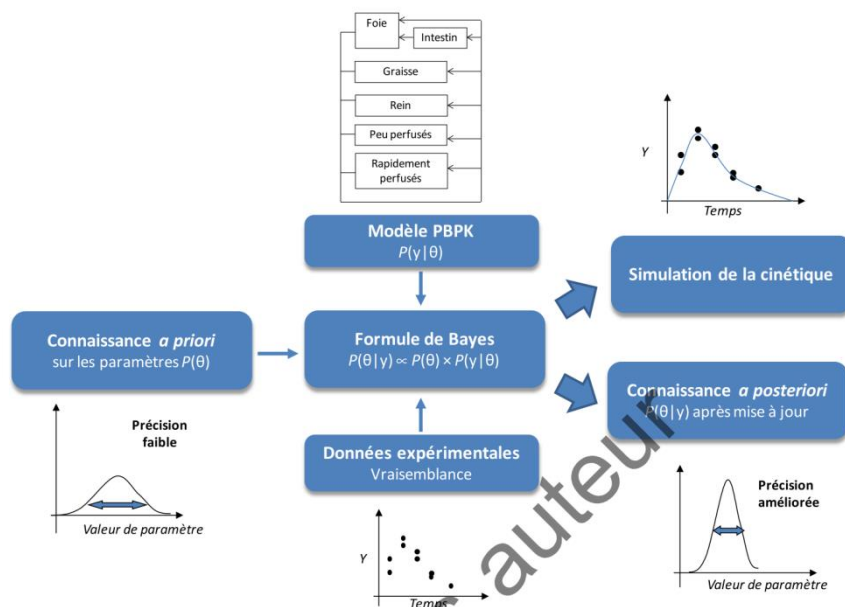


FIGURE 5. Mise en œuvre de la calibration bayésienne d'un modèle PBPK.

Une distribution *a priori* doit traduire les connaissances sur le paramètre avant l'observation des données à analyser. La connaissance *a priori* inclut, par exemple, les données publiées précédemment sur l'espèce, la population étudiée et la substance (par exemple, des données *in vitro* ou *in vivo* générées lors d'expérimentations précédentes), mais aussi des données qui auraient été obtenues pour d'autres substances de la même famille chimique ou encore l'avis d'experts. Un vaste choix de distributions de probabilité est ensuite disponible pour traduire cette connaissance (par exemple, loi uniforme pour une distribution non informative, ou une loi normale pour une distribution informative). La distribution *a priori* peut donc être interprétée en termes de degré de croyance sur les valeurs possibles du paramètre.

La forme de la vraisemblance, $P(y|\theta)$, dépend d'une part du modèle déterministe (le modèle PBPK dans notre cas), mais aussi du modèle d'erreur sur les données. Dans le cadre d'études de cinétique, ces mesures correspondent souvent à des concentrations dans les biofluides (sang, urine) ou dans les tissus. Il est courant de recourir au modèle log-normal pour décrire l'erreur analytique de telles mesures.

Pour définir la variance du terme d'erreur, deux approches sont possibles : soit la variance est constante⁴⁰, soit elle est dépendante de la concentration mesurée et augmente pour les concentrations proches de la limite de quantification de l'appareil de mesure⁴¹.

Une fois les distributions *a priori* et la vraisemblance définies, l'expression analytique de la loi *a posteriori* $P(\theta|y)$ pourra être déterminée uniquement dans les cas les plus simples, tels que les modèles linéaires. Dans les autres cas, il sera possible d'avoir recours aux méthodes de simulations Monte-Carlo par chaînes de Markov (MCMC) pour échantillonner des valeurs de paramètres issus de la distribution *a posteriori* sans connaître l'expression analytique de cette dernière. Plusieurs algorithmes ont été proposés pour construire des chaînes MCMC. Les plus utilisés pour la calibration de modèles PBPK sont l'algorithme de Metropolis-Hastings et l'échantillonnage de Gibbs, pour lequel la connaissance de l'expression analytique des lois de distributions conditionnelles de chaque variable du modèle en fonction des autres variables et des données est requise⁴².

1.4] Évaluation des modèles PBPK

Le processus d'évaluation doit être une partie intégrante du développement du modèle. L'évaluation passe par la vérification du modèle et, si possible, sa validation. Ces étapes sont nécessaires pour démontrer objectivement la fiabilité et la pertinence du modèle et ainsi permettre son utilisation par d'autres utilisateurs⁴³.

[40] Maura Mezzetti *et al.*, « A Bayesian compartmental model for the evaluation of 1,3-butadiene metabolism », *Journal of the Royal Statistical Society Series C-Applied Statistics*, 52, 2003, p. 291-305 @ ; Anna-Karin Mork, Fredrik Jonsson & Gunnar Johanson, « Bayesian population analysis of a washin-washout physiologically based pharmacokinetic model for acetone », *Toxicology and Applied Pharmacology*, 240(3), 2009, p. 423-432 @.

[41] Jon C. Wakefield & Amy Racine-Poon, « An application of Bayesian population pharmacokinetic pharmacodynamic models to dose recommendation », *Statistics In Medicine*, 14, 1995, p. 971-986 @ ; Céline Brochot & Frédéric Y. Bois, « Use of a chemical probe to increase safety for human volunteers in toxicokinetic studies », *Risk Analysis*, 25(6), 2005, p. 1559-1571 @.

[42] Andrew Gelman *et al.*, *Bayesian Data Analysis*, London, Chapman & Hall, 1995, p. 526 ; Walter R. Gilks, Sylvia Richardson & David J. Spiegelhalter, *Markov Chain Monte Carlo in Practice*, London, Chapman & Hall, 1996, p. 486.

[43] Weihsueh A. Chiu *et al.*, « Evaluation of physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment », *Journal of Applied Toxicology*, 27(3), 2007, p. 218-237 @.

Généralement, au moins un ensemble de données expérimentales est utilisé pour vérifier le comportement du modèle. Ces données permettent de s'assurer que le modèle est capable de reproduire la cinétique de la molécule, par exemple les pics et variations de la concentration. Cependant, l'étape de vérification ne se limite pas à cette confrontation entre les prédictions du modèle et les données mais nécessite aussi de s'assurer de la vraisemblance de la structure du modèle, de sa paramétrisation et de la justesse mathématique des équations (par exemple, conservation du bilan massique et des flux sanguins)⁴⁴. En raison de la description mécanistique des processus ADME, la structure du modèle et les valeurs prises par les paramètres doivent être en accord avec la réalité biologique. En conséquence un modèle paramétré avec des valeurs incohérentes au regard des connaissances physiologiques et biologiques ne pourra pas être considéré dans un autre cadre que celui de son développement et nécessitera l'acquisition de nouvelles données afin d'expliquer ces valeurs incohérentes. Le processus de validation va plus loin que le processus de vérification puisqu'il permet d'explorer les capacités prédictives du modèle PBPK pour différentes conditions expérimentales. La comparaison entre prédictions et observations ne se limite donc pas aux données qui ont servi à développer le modèle mais doit s'appliquer à l'ensemble des données disponibles pour d'autres voies d'exposition, d'autres doses... À l'issue de la validation, le domaine de validité du modèle PBPK sera défini⁴⁵.

Dans le cadre des modèles PBPK, les termes vérification et validation sont souvent associés à un objectif prédéfini, à savoir une mesure de dosimétrie interne pertinente pour le mode d'action de la substance (par exemple, l'aire sous la courbe ou la concentration maximale dans les tissus cibles). Il est rarement possible de vérifier et valider le modèle dans sa globalité. Ceci nécessiterait un nombre important de données expérimentales, c'est-à-dire pour l'ensemble des variables d'état (évolution temporelle de la concentration dans tous les compartiments) et des paramètres du modèle pour divers scénarios d'exposition. L'acquisition de telles données est inenvisa-

[44] International Programme on Chemical Safety (IPCS), *op. cit.*, 2010.

[45] Sandrine Micallef, Céline Brochot & Frédéric Y. Bois, « L'analyse statistique bayésienne de données toxicocinétiques », *Environnement, Risques & Santé*, 4(1), 2005, p. 21-34 @.

geable en raison des coûts financiers et éthiques qu'elle engendrerait. L'objectif ici reste donc d'établir de la confiance dans les prédictions du modèle pour un nombre restreint de variables en se basant sur une description réaliste des processus ADME, sur la qualité des valeurs des paramètres ainsi que sur la capacité du modèle à reproduire des données expérimentales indépendantes.

1.5] Analyse d'incertitude et de variabilité

Un modèle PBPK est souvent développé avec des valeurs de paramètres représentant un individu «moyen». Pour explorer complètement le comportement du modèle, des analyses de variabilité et d'incertitude doivent être conduites⁴⁶. La variabilité est définie comme étant la variation naturelle d'un phénomène, tandis que l'incertitude réfère au degré de précision de la connaissance actuelle sur un phénomène. La propagation de l'incertitude et de la variabilité sur les valeurs de paramètres peut être simulée par des méthodes Monte-Carlo afin de quantifier leur impact sur les cinétiques prédites⁴⁷. Les méthodes Monte-Carlo permettent d'échantillonner pour chaque paramètre une distribution de probabilité reflétant le degré de connaissance actuel ou sa variabilité. Pour chaque valeur échantillonnée, le modèle PBPK simule la cinétique. L'analyse des cinétiques obtenues pour les valeurs de paramètres échantillonnées permet d'obtenir des densités de probabilité pour chacune des sorties du modèle. Ces méthodes permettent donc de ne plus raisonner sur une valeur mais sur des distributions et ainsi de détecter si des valeurs de paramètres peuvent conduire à une augmentation significative du risque lié à l'exposition à une substance pour certains individus⁴⁸.

[46] Hugh A. Barton *et al.*, «Characterizing uncertainty and variability in physiologically based pharmacokinetic models: State of the science and needs for research and implementation», *Toxicological Sciences*, 99(2), 2007, p. 395-402 @.

[47] Daan Huizer *et al.*, «Separating uncertainty and physiological variability in human PBPK modelling: The example of 2-propanol and its metabolite acetone», *Toxicology Letters*, 214(2), 2012, p. 154-165 @ ; Russell S. Thomas *et al.*, «Incorporating Monte Carlo Simulation into Physiologically Based Pharmacokinetic Models Using Advanced Continuous Simulation Language (ACSL): A Computational Method», *Fundamental and Applied Toxicology*, 31(1), 1996, p. 19-28 @.

[48] Harvey J. Clewell 3rd & Melvin E. Andersen, «Use of physiologically based pharmacokinetic modeling to investigate individual versus population risk», *Toxicology*, 111(1-3), 1996, p. 315-329.

1.6] Logiciels

De nombreux logiciels sont disponibles pour résoudre les systèmes d'équations différentielles générés par un modèle PBPK. Ces logiciels peuvent être soit généralistes, soit très spécifiques. Ces derniers sont généralement conçus pour répondre aux besoins des industriels et possèdent une interface attractive et accessible. Cependant, les logiciels spécifiques n'autorisent pas de modifier les équations des modèles PBPK déjà codées mais uniquement de modifier les valeurs des paramètres. Parmi ces logiciels, peuvent être cités le simulateur Simcyp pour les analyses de variabilité au sein de la population humaine, GastroPlus conçu initialement pour décrire en détail les mécanismes de l'absorption orale, PK-Sim et Cloe PK. Les logiciels généralistes ont l'avantage de proposer de nombreuses fonctionnalités telles que l'estimation statistique des paramètres à partir de cinétiques mesurées, mais ne possèdent pas forcément d'interface graphique. Les logiciels généralistes les plus utilisés en modélisation pharmacocinétique sont aclsX, Berkeley Madonna ou encore GNU MCSim⁴⁹. Le choix du logiciel se fait donc selon le but recherché et, surtout, selon les compétences de l'utilisateur.

2] Applications des modèles PBPK en toxicologie et pharmacologie

2.1] Un cadre paramétrique pour l'extrapolation à des conditions réelles d'exposition

La majorité des données toxicologiques est obtenue lors d'expositions contrôlées en laboratoire d'animaux ou de volontaires humains à des doses très faibles, lors de suivis de travailleurs en exposition non contrôlée et aussi après des accidents industriels sur les populations exposées. De par leur description physiologique de l'organisme et mécanistique des processus ADME, les modèles PBPK fournissent un cadre paramétrique adéquat pour extrapoler les résultats obtenus lors des études en laboratoire à des situations réelles d'exposition pour la population humaine. En particulier, les modèles PBPK permettent d'extrapoler le comportement cinétique des molécules entre espèces (animaux de laboratoire aux humains), entre voies d'exposition, de

[49] Frédéric Y. Bois & Don R. Maszle, « MCSim : a simulation program », *Journal of Statistical Software*, 2(9), 1997 @.

fortes à faibles doses, entre scénarios d'exposition (exposition continue ou aiguë), entre individus (variabilité interindividuelle), et pour un même individu (variabilité intra-individuelle). Pour toutes ces extrapolations, un même principe prévaut : la formulation mathématique du modèle est supposée identique quelles que soient les conditions expérimentales, les espèces ou individus exposés et seules les valeurs des paramètres du modèle expliquent les différences observées sur les profils cinétiques. La seule précaution à prendre est de s'assurer que les nouvelles conditions expérimentales appartiennent bien au domaine de validité du modèle. Idéalement, les extrapolations obtenues devraient être validées avec au moins un ensemble de données indépendant.

Les conditions expérimentales lors d'expositions en laboratoire sont bien souvent éloignées de celles rencontrées dans notre vie quotidienne. La dose, la durée et la fréquence des expositions sont des paramètres du modèle PBPK. Il suffit alors de modifier la valeur de ces paramètres pour prédire le comportement de la substance pour de nouveaux scénarios d'exposition. Ces extrapolations restent cependant délicates en raison de phénomènes de saturation qui peuvent affecter le métabolisme et l'élimination des composés à de fortes doses⁵⁰. Ces saturations engendreront des non-linéarités au niveau de la cinétique qu'il sera nécessaire d'avoir pris en compte lors du développement du modèle PBPK. D'autres phénomènes peuvent aussi engendrer une cinétique non linéaire, tels que l'induction, l'inactivation ou la déplétion d'enzyme. En plus des extrapolations interdurée et interdose, il est possible de transposer entre voies d'administration⁵¹. Une fois dans le corps, la substance se distribue selon les mêmes mécanismes indépendamment de la voie d'administration. Pour extrapoler à une autre voie d'administration, il est nécessaire d'avoir modélisé la nouvelle phase d'absorption afin de quantifier la dose de substance atteignant la circulation systémique. Dans le cas d'expositions par voie orale, le métabolisme de premier passage et la circulation entéro-hépatique devront être modélisés si ces mécanismes résultent en une élimination significative de la substance.

[50] A. John Bailer & David A. Dankovic, « An introduction to the use of physiologically based pharmacokinetic models in risk assessment », *Statistical Methods in Medical Research*, 6, 1997, p. 341-358 @.

[51] Hans Mielke *et al.*, « Physiologically based toxicokinetic modelling as a tool to assess target organ toxicity in route-to-route extrapolation-The case of coumarin », *Toxicology Letters*, 202(2), 2011, p. 100-110 @.

L'extrapolation interespèce avec un modèle PBPK se base sur le fait que les mammifères disposent d'une anatomie similaire de par la présence et l'agencement des organes au sein de leur organisme et d'un système circulatoire. Un modèle PBPK développé à partir de données animales est extrapolé à une espèce cible en affectant aux paramètres du modèle des valeurs concernant cette nouvelle espèce⁵². Pour les paramètres substance-dépendant tels que les vitesses de métabolisme, l'extrapolation devra intégrer les différences interespèces au niveau de leur équipement enzymatique (présence ou pas de certaines enzymes et quantité des enzymes).

De manière identique, il est possible d'extrapoler des résultats obtenus chez une population à une autre population. Ceci est notamment utile pour extrapoler des résultats obtenus en laboratoire chez des individus similaires (généralement même ethnie⁵³, même âge, même condition physique, etc.) à des populations non testées. Comme pour les transpositions interespèces, il suffit d'assigner aux paramètres du modèle des valeurs tenant compte des caractéristiques particulières de ces populations. Une source importante de variation entre individus se situe au niveau de l'activité enzymatique conséquence du polymorphisme génétique. La fréquence allélique d'un gène varie au sein de la population mondiale ou d'une ethnie à l'autre entraînant la coexistence de plusieurs phénotypes. Ainsi, dans le cas du métabolisme, quatre phénotypes peuvent coexister : les métaboliseurs ultrarapides, rapides, intermédiaires et lents⁵⁴. Entre différentes ethnies, la proportion des phénotypes peut varier : dans le cas du cytochrome CYP2D6, 40 % de la population nord-africaine sont des métaboliseurs ultrarapides, contre 10 % dans la population du Moyen-Orient et 2 % chez les Européens. Cette variabilité phénotypique se retrouve aussi au sein d'une même population. Par exemple, la majorité (85 %) de la population européenne

[52] Frank Welsch, Gregory M. Blumenthal & Rory B. Conolly, « Physiologically based pharmacokinetic models applicable to organogenesis: extrapolation between species and potential use in prenatal toxicity risk assessments », *Toxicology Letters*, 82-83, 1995, p. 539-547 @ ; Karen Watanabe & Frédéric Y. Bois, « Interspecies extrapolation of physiological pharmacokinetic parameter distributions », *Risk Analysis*, 16, 1996, p. 741-754 @.

[53] Le terme « ethnie », ici, est à comprendre selon une acception relevant de l'anthropologie biologique, et non pas de l'ethnologie.

[54] Urs A. Meyer, « Pharmacogenetics and adverse drug reactions », *Lancet*, 356(9242), 2000, p. 1667-1671 @.

est métaboliseur rapide pour le CYP2D6, mais 2 % auront une activité augmentée (ultrarapide) et 13 % une activité diminuée⁵⁵. Outre le profil génétique, l'état de santé peut s'avérer être un paramètre important lors de l'extrapolation des résultats. En effet, certains individus peuvent avoir une insuffisance hépatique ou rénale modifiant essentiellement la valeur des clairances d'élimination⁵⁶. Ces informations quantitatives sur les paramètres sont essentielles pour identifier des populations à risque et pour simuler les cinétiques de composés chez ces mêmes populations afin, par exemple, d'ajuster le dosage d'un médicament.

Il peut enfin exister une variation intra-individuelle, l'anatomie et la physiologie d'un même individu évoluant au cours de sa vie. Là encore, les valeurs des paramètres du modèle peuvent expliquer les différents profils cinétiques pris par une molécule chez un même individu à diverses périodes de sa vie, de l'enfant⁵⁷ à la personne âgée⁵⁸ en passant par la personne en surpoids⁵⁹ ou la femme enceinte⁶⁰. Les changements individuels facilement identifiables se situent au niveau des paramètres anatomiques, c'est-à-dire la masse corporelle, les volumes des organes et les flux sanguins. D'autres changements concernent les paramètres biochimiques, tels que la capacité enzyma-

[55] Magnus Ingelman-Sundberg *et al.*, « Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: Pharmacogenetic, pharmacoeconomic and clinical aspects », *Pharmacology & Therapeutics*, 116(3), 2007, p. 496-526 @ ; Johanna Sistonen *et al.*, « CYP2D6 worldwide genetic variation shows high frequency of altered activity variants and no continental structure », *Pharmacogenetics and Genomics*, 17(2), 2007, p. 93-101.

[56] Andrea N. Edginton & Stefan Willmann, « Physiology-Based Simulations of a Pathological Condition Prediction of Pharmacokinetics in Patients with Liver Cirrhosis », *Clinical Pharmacokinetics*, 47(11), 2008, p. 743-752 @ ; Roger K. Verbeeck & Flora T. Musumba, « Pharmacokinetics and dosage adjustment in patients with renal dysfunction », *European Journal of Clinical Pharmacology*, 65(8), 2009, p. 757-773 @.

[57] William R. Crom, « Pharmacokinetics in the Child », *Environmental Health Perspectives*, 102, 1994, p. 111-117 @.

[58] Arduino A. Mangoni & Stephen H.D. Jackson, « Age-related changes in pharmacokinetics and pharmacodynamics: basic principles and practical applications », *British Journal of Clinical Pharmacology*, 57(1), 2004, p. 6-14 @.

[59] Michael J. Hanley, Darrell R. Abernethy & David J. Greenblatt, « Effect of Obesity on the Pharmacokinetics of Drugs in Humans », *Clinical Pharmacokinetics*, 49(2), 2010, p. 71-87 @.

[60] Khaled Abduljalil *et al.*, « Anatomical, Physiological and Metabolic Changes with Gestational Age during Normal Pregnancy A Database for Parameters Required in Physiologically Based Pharmacokinetic Modelling », *Clinical Pharmacokinetics*, 51(6), 2012, p. 365-396 @.

tique impliquée dans le métabolisme⁶¹ ou les facteurs influant l'élimination rénale. L'ensemble des évolutions connues a été transcrit sous la forme d'équations afin de pouvoir être intégré dans un modèle PBPK⁶². En conséquence, plusieurs modèles PBPK ont été développés pour décrire la cinétique de molécule durant la période prénatale avec le développement du fœtus⁶³, pendant l'enfance⁶⁴, lors d'événements tels que la grossesse et la lactation⁶⁵, et lors de la vie entière⁶⁶.

2.2] Un outil en évaluation du risque toxicologique

En quelques années, la modélisation PBPK s'est imposée en évaluation du risque toxicologique au niveau de la caractérisation de la relation dose-réponse, notamment pour sa capacité à extrapoler entre différentes conditions expérimentales (voir ci-dessus). L'utilisation de tels modèles a impliqué de repenser les méthodologies mises en place. En effet, les modèles dose-réponse traditionnellement utilisés en évaluation du risque lient la survenue d'effets indésirables à la

[61] Trevor N. Johnson, Amin Rostami-Hodjegan & Geoffrey T. Tucker, « Prediction of the clearance of eleven drugs and associated variability in neonates, infants and children », *Clinical Pharmacokinetics*, 45(9), 2006, p. 931-956 @.

[62] Karine Price, Sami Haddad & Kannan Krishnan, « Physiological modeling of age-specific changes in the pharmacokinetics of organic chemicals in children », *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A*, 66(5), 2003, p. 417-433 @ ; John F. Young *et al.*, « Human Organ/Tissue Growth Algorithms that Include Obese Individuals and Black/White Population Organ Weight Similarities from Autopsy Data », *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A-Current Issues*, 72(8), 2009, p. 527-540 @.

[63] Richard H. Luecke *et al.*, « A Physiologically-Based Pharmacokinetic Computer-Model for Human-Pregnancy », *Teratology*, 49(2), 1994, p. 90-103 @.

[64] Andrea N. Edginton, Walter Schmitt & Stefan Willmann, « Development and evaluation of a generic physiologically based pharmacokinetic model for children », *Clinical Pharmacokinetics*, 45(10), 2006, p. 1013-1034 @ ; Marc-André Verner *et al.*, « A Physiologically based pharmacokinetic model for the assessment of infant exposure to persistent organic pollutants in epidemiologic studies », *Environmental Health Perspectives*, 117(3), 2009, p. 481-487 @.

[65] P. Robinan Gentry, Tammy R. Covington & Harvey J. Clewell, « Evaluation of the potential impact of pharmacokinetic differences on tissue dosimetry in offspring during pregnancy and lactation », *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 38(1), 2003, p. 1-16 @.

[66] Rémy Beaudouin, Sandrine Micallef & Céline Brochot, « A stochastic whole-body physiologically based pharmacokinetic model to assess the impact of inter-individual variability on tissue dosimetry over the human lifespan », *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 57(1), 2010, p. 103-116 @ ; Harvey J. Clewell *et al.*, « Evaluation of the potential impact of age- and gender-specific pharmacokinetic differences on tissue dosimetry », *Toxicological Sciences*, 79(2), 2004, p. 381-393 @.

dose administrée. Des études animales permettent généralement de déterminer empiriquement la relation dose administrée-effet et ensuite des facteurs d'ajustement, d'incertitude et/ou de variabilité sont appliqués pour transposer cette relation à l'humain. De telles relations dose administrée-effet ne sont pas simples à comprendre et à analyser en raison des nombreux facteurs les régissant, tels que les processus ADME et les interactions avec les tissus, et sont alors souvent dépendantes d'une voie et d'un scénario d'exposition. Intégrer la description de la toxicocinétique de la substance permet de lever ces dépendances mais nécessite de décomposer la relation dose-effet classique en relation dose administrée → dose interne efficace → effet. Cette décomposition permet alors de ne plus lier l'effet toxique à la dose administrée mais à une dose interne pertinente (ou efficace) pour le mode d'action de la substance et le scénario d'exposition. Selon cette nouvelle approche, l'analyse des études expérimentales animales se fait en deux étapes: un modèle PBPK pour lier la dose administrée et la dose interne efficace, et un modèle toxicodynamique pour lier la dose interne à l'apparition des effets⁶⁷. Cette décomposition simplifie l'extrapolation de l'animal à l'humain puisque la toxicodynamie est supposée indépendante de l'espèce (c'est-à-dire qu'une même dose interne efficace chez différentes espèces conduira aux mêmes niveaux d'effet) et que l'extrapolation de la toxicocinétique est effectuée sur des bases mécanistiques par le modèle PBPK. Selon le niveau d'effet désiré, la valeur de la dose interne efficace est calculée par le modèle PBPK chez l'animal. Ensuite le modèle PBPK extrapolé à l'humain permet d'estimer la concentration d'exposition selon le scénario défini par l'évaluateur (exposition sur la vie entière, exposition aiguë, etc.) qui conduira à cette même valeur de dose interne efficace. Ainsi de nouveaux seuils d'exposition externe peuvent être définis pour les populations humaines en tenant compte de la toxicocinétique des substances chimiques et en réduisant le recours à des facteurs d'ajustement arbitraires.

[67] Harvey J. Clewell, Melvin E. Andersen & Hugh A. Barton, «A consistent approach for the application of pharmacokinetic modeling in cancer and noncancer risk assessment», *Environmental Health Perspectives*, 110(1), 2002, p. 85-93 @ ; Environmental Protection Agency (US EPA), *op. cit.*, 2006; M.E. (Bette) Meek *et al.*, «Case study illustrating the WHO IPCS guidance on characterization and application of physiologically based pharmacokinetic models in risk assessment», *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 66(1), 2013, p. 116-129 @.

Le choix de la dose interne efficace est crucial pour mener une évaluation du risque appropriée. Cette dose doit être étroitement liée à l'apparition des effets indésirables et au mode d'action de la substance. La dose interne efficace doit donc tenir compte de la substance active qui engendre les effets (c'est-à-dire la substance parente ou un métabolite), du niveau, de la durée et de l'intensité de l'exposition (exposition aiguë/chronique, fenêtre d'exposition, etc.) et enfin de la matrice biologique d'intérêt – par exemple, le(s) tissu(s) cible(s) ou le sang⁶⁸. En raison de la diversité des situations possibles, différentes doses internes efficaces ont été proposées⁶⁹. Par exemple, les effets chroniques non cancérogènes sont souvent liés à l'aire sous la courbe (AUC) quotidienne dans les tissus cibles ou dans le sang⁷⁰. Pour les substances cancérogènes induisant des métabolites intermédiaires réactifs, la dose interne efficace sera la quantité de métabolites produits par unité de temps ou la quantité de métabolites dans les tissus cibles sur une période donnée⁷¹. Pour des effets développementaux, une dose interne sera calculée lors de la fenêtre de sensibilité maximale. Pour des effets aigus, la dose efficace pourra prendre la forme de la concentration maximale atteinte dans les tissus cibles⁷². Enfin, il est à noter que les modèles PBPK peuvent aussi être utilisés pour tester des hypothèses et en particulier choisir parmi plusieurs doses internes efficaces.

Le développement de modèles PBPK pour les substances chimiques a su s'adapter aux besoins de l'évaluation du risque et ainsi permettre de mieux caractériser les doses internes efficaces. En effet, les modèles

[68] International Programme on Chemical Safety (IPCS), *op. cit.*, 2010.

[69] Melvin E. Andersen & James E. Dennison, « Mode of action and tissue dosimetry in current and future risk assessments », *Science of the Total Environment*, 274(1-3), 2001, p. 3-14 @.

[70] Emmanuelle M. Voisin *et al.*, « Extrapolation of Animal Toxicity to Humans - Interspecies Comparisons in Drug Development », *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 12(2), 1990, p. 107-116 @.

[71] Alan F. Sasso *et al.*, « Application of an Updated Physiologically Based Pharmacokinetic Model for Chloroform to Evaluate CYP2E1-Mediated Renal Toxicity in Rats and Mice », *Toxicological Sciences*, 131(2), 2013, p. 360-374 @ ; Lisa M. Sweeney *et al.*, « Cancer mode of action, weight of evidence, and proposed cancer reference value for hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) », *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 64(2), 2012, p. 205-224 @.

[72] Mathieu Valcke & Kannan Krishnan, « Assessing the impact of the duration and intensity of inhalation exposure on the magnitude of the variability of internal dose metrics in children and adults », *Inhalation Toxicology*, 23(14), 2011, p. 863-877 @.

PBPK ont tendance à se complexifier afin d'intégrer la diversité des expositions et des modes d'action des substances. En particulier, des modèles PBPK décrivant les changements physiologiques et biochimiques des individus sur leurs vies entières ont été proposés afin de caractériser les expositions chroniques à des contaminants persistants⁷³. D'autres modèles permettent de se focaliser sur les niveaux internes de contamination lors de périodes de sensibilité maximale (par exemple, pendant la vie *in utero*) pour des molécules agissant sur le développement neuronal ou hormonal⁷⁴. Enfin, les modèles PBPK ne concernent plus uniquement les molécules parentes mais décrivent aussi la toxicocinétique de métabolites actifs ou facilement détectables dans les tissus ou fluides humains⁷⁵.

2.3] Un lien entre l'exposition et la biosurveillance des populations

Dans les différents domaines d'applications présentés précédemment, les modèles PBPK sont utilisés pour simuler les concentrations internes ou dans les fluides biologiques d'un composé et/ou de ses métabolites à partir d'une dose administrée connue. Récemment, ces modèles ont été utilisés en épidémiologie dans un contexte de dosimétrie inverse afin de lier des mesures biologiques individuelles collectées lors de campagnes de biosurveillance à un scénario d'exposition non connu⁷⁶. Dans ce contexte, il s'agit d'estimer l'exposition la plus vraisemblable d'un individu ou d'une population à une substance, à partir de concentrations internes (par exemple, dans le sang ou les urines), et de simuler le profil toxicocinétique du composé actif (substance parente ou métabolites) dans les tissus cibles. Ceci a pour but de placer les données de biosurveillance dans un schéma classique d'évaluation des risques « exposition → dose au niveau du tissu cible → effets néfastes sur la santé ». La dosimétrie inverse ou reconstruction de dose repose sur trois composantes : les mesures d'imprégnation de la population, le modèle toxicocinétique et le scénario d'exposition.

[73] Beaudouin, Micallef & Brochet, *op. cit.*, 2010.

[74] Richard H. Luecke, Walter D. Wosilait & John F. Young, « Mathematical analysis for teratogenic sensitivity », *Teratology*, 55(6), 1997, p. 373-380 @.

[75] Brochet, Smith & Bois, *op. cit.*, 2007.

[76] Michael A. Lyons *et al.*, « Computational toxicology of chloroform : Reverse dosimetry using Bayesian inference, Markov chain Monte Carlo simulation, and human biomonitoring data », *Environmental Health Perspectives*, 116(8), 2008, p. 1040-1046 @.

Les mesures d'imprégnation humaine sont réalisées dans des fluides ou tissus biologiques qu'il est possible de prélever facilement, tels que le sang, les urines, le lait maternel, les cheveux, les fécès ou encore les ongles. L'échantillon sanguin présente l'avantage de fournir le niveau de substance circulant dans le corps et au contact des organes, tandis que les autres milieux représentent les niveaux de substance excrétés ou stockés. Cependant, les prélèvements sanguins sont assez lourds à réaliser et aussi très limités en volume et en nombre pour certaines populations telles que les jeunes enfants. Les prélèvements urinaires ne sont pas invasifs et parfaitement adéquats pour réaliser des reconstructions de dose si les conditions suivantes sont réunies⁷⁷ : le composé et ses principaux métabolites sont excrétés uniquement dans les urines ou bien la fraction excrétée est connue ; les substances mesurées représentent toutes les espèces majoritaires urinaires (composé et métabolites) ou le rapport stoechiométrique entre composé et métabolites peut être estimé ; les échantillons d'urine sont bien caractérisés (avec des mesures simultanées de la créatinine afin d'estimer la filtration glomérulaire et de normaliser les mesures réalisées) avec un suivi du temps et du volume d'échantillonnage.

En raison des coûts financiers engendrés par les analyses chimiques et de la disponibilité des participants, il est rarement possible d'obtenir plusieurs prélèvements pour un même individu.

Les modèles toxicocinétiques permettent de décrire les processus ADME et ainsi de relier les mesures de concentrations du composé ou de ses métabolites dans un milieu biologique avec une exposition. La figure 6 présente les relations entre les données d'imprégnation et la toxicocinétique des substances. Pour la dosimétrie inverse, le modèle toxicocinétique doit être déjà calibré pour la ou les substances d'intérêt à partir de données indépendantes des données de biosurveillance. Le modèle utilisé devra nécessairement prendre en compte le temps de résidence dans l'organisme mais aussi les propriétés biochimiques de la substance étudiée. En effet, dans le cas de composés lipophiles, comme les PCB (polychlorobiphényles), des variations du poids corporel et des tissus adipeux au cours de la vie peuvent avoir un impact important sur le volume de distribution et la demi-vie apparente. Une

[77] Harvey J. Clewell *et al.*, « Quantitative interpretation of human biomonitoring data », *Toxicology and Applied Pharmacology*, 231(1), 2008, p. 122-133 @.

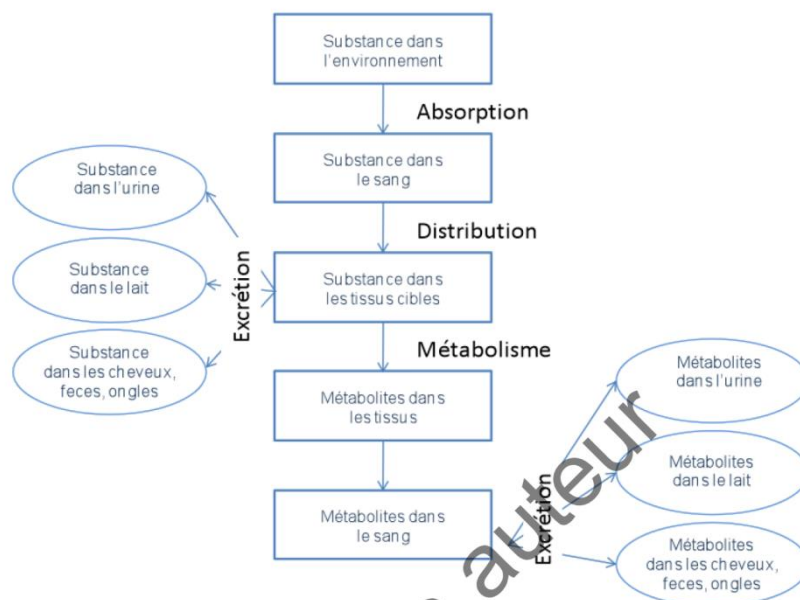


FIGURE 6. Représentation schématique des liens entre la dose d'exposition et les concentrations dans les différents milieux biologiques comme le sang, les urines, les fèces, le lait, les cheveux, les ongles (cf. Sean M. Hays *et al.*, « Biomonitoring equivalents : A screening approach for interpreting biomonitoring results from a public health risk perspective », *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 47(1), 2007, p. 96-109 @).

interprétation précise des données de biosurveillance sur les composés fortement lipophiles nécessite ainsi l'utilisation de modèles toxicocinétiques qui incorporent des changements dans la composition du corps, notamment en graisse en fonction de l'âge⁷⁸. Dans d'autres cas, des variations de la fixation sur un tissu peuvent être fonction non seulement du volume du tissu mais aussi de son état physiologique. Par exemple, le plomb a un comportement chimique assez proche du calcium et se fixe à 90 % sur les os⁷⁹. Sa fixation se fait de manière différente chez les enfants qui sont en croissance et chez les adultes.

[78] Matthew Lorber, « A pharmacokinetic model for estimating exposure of Americans to dioxin-like compounds in the past, present, and future », *Science of the Total Environment*, 288(1-2), 2002, p. 81-95 @ ; Clewell *et al.*, *op. cit.*, 2004.

[79] Ellen J. O'Flaherty, « Physiologically Based Models for Bone-Seeking Elements. II. Kinetics of Lead Disposition in Rats », *Toxicology and Applied Pharmacology*, 111(2), 1991, p. 313-331 @.

La dernière composante de la dosimétrie inverse est l'exposition. Elle peut avoir lieu par de multiples voies et mécanismes (par exemple, exposition directe à un métabolite *vs* exposition au composé parent) et peut prendre diverses formes telles qu'une exposition continue sur la journée ou des expositions uniquement lors des repas pour les contaminants alimentaires. Il est donc souvent indispensable d'avoir de solides connaissances sur les caractéristiques de l'exposition, telles que la fréquence et la durée. Ces informations qualitatives peuvent être recueillies par l'intermédiaire de questionnaires posés à l'ensemble des individus participant à l'étude. Pour les substances où la voie alimentaire est majoritaire, des questions sur les habitudes alimentaires permettront de définir différents profils d'exposition qui seront alors comparés aux valeurs estimées par dosimétrie inverse.

Parmi les études qui se sont intéressées à la reconstruction de dose, il est possible de faire la distinction entre deux grands types de composés pour lesquels les temps de résidence dans le corps sont très différents : les composés persistants⁸⁰ et les non persistants⁸¹.

Du fait de leur temps de résidence assez long dans les organismes, les composés persistants ont tendance à s'accumuler dans les tissus à des concentrations importantes et potentiellement à engendrer des problèmes pour la santé. Les composés persistants ont une demi-vie de l'ordre de l'année. Leur longue durée de vie tend ainsi à lisser les variations de l'exposition et les biomarqueurs mesurés sont donc généralement représentatifs d'une exposition moyenne. Cependant, les concentrations d'exposition à une substance peuvent varier en fonction de l'évolution des réglementations comme l'interdiction de produire et

[80] Ruth E. Alcock *et al.*, « A generic model of human lifetime exposure to persistent organic contaminants: development and application to PCB-101 », *Environmental Pollution*, 110(2), 2000, p. 253-265 @ ; Lesa L. Aylward *et al.*, « Concentration-dependent TCDD elimination kinetics in humans: toxicokinetic modeling for moderately to highly exposed adults from Seveso, Italy, and Vienna, Austria, and impact on dose estimates for the NIOSH cohort », *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology*, 15(1), 2005, p. 51-65 @ ; Verner *et al.*, *op. cit.*, 2009.

[81] Panos G. Georgopoulos, Amit Roy & Michael A. Gallo, « Reconstruction of Short-Term Multiroute Exposure to Volatile Organic-Compounds Using Physiologically-Based Pharmacokinetic Models », *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology*, 4(3), 1994, p. 309-328 @ ; Yu-Mei Tan *et al.*, « Use of a physiologically based pharmacokinetic model to identify exposures consistent with human biomonitoring data for chloroform », *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues*, 69(18), 2006, p. 1727-1756 @.

d'utiliser certaines substances, ce qui modifie les profils d'exposition au cours du temps. Dans ce cas, il est possible non pas d'estimer une exposition moyenne mais le profil d'exposition le plus probable, comme dans les cas des PCB⁸². De par leur nature, les composés persistants ont tendance à être métabolisés et excrétés lentement. Ainsi, les données de biosurveillance sont en général des mesures de concentrations de la substance dans le sang ou dans les autres tissus, plutôt que des mesures urinaires.

Les composés non persistants ont des demi-vies de l'ordre de quelques heures et sont le plus souvent mesurés dans les urines. Pour ces composés, les concentrations mesurées sont très largement influencées par les expositions les plus récentes. Il est absolument nécessaire de connaître la relation temporelle entre la mesure du biomarqueur et l'exposition supposée la plus récente⁸³. Il est aussi préférable de réaliser des prélèvements à différents temps pendant la journée plutôt qu'à un temps unique, afin de mieux estimer les variations d'exposition au cours de la journée.

Finalement, les données de biosurveillance ne fournissent pas une mesure directe de la dose de la substance au niveau du tissu cible. Utiliser des modèles PBPK permet d'estimer non seulement l'exposition par dosimétrie inverse mais aussi d'estimer des concentrations au niveau de tissus ou organes cibles qui ne peuvent être échantillonnés et ainsi faire le lien avec des effets sur la santé.

2.4] Une aide pour le développement des molécules thérapeutiques

Alors que les modèles PBPK sont très utilisés dans le domaine de l'analyse de risque, ils demeuraient, il y a encore quelques années, peu développés dans le domaine pharmaceutique⁸⁴. Cependant, face aux coûts (de l'ordre d'un milliard d'euros) et au temps (au moins

[82] Maria M. Ulaszewska *et al.*, «Interpreting PCB levels in breast milk using a physiologically based pharmacokinetic model to reconstruct the dynamic exposure of Italian women», *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, 22(6), 2012, p. 601-609 @.

[83] Florence A. Zeman *et al.*, «Exposure assessment of phthalates in French pregnant women: Results of the ELFE pilot study», *International journal of hygiene and environmental health*, 216(3), 2013, p. 271-279 @.

[84] Andrea N. Edginton *et al.*, «Whole body physiologically-based pharmacokinetic models: their use in clinical drug development», *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 4(9), 2008, p. 1143-1152 @.

quinze ans) nécessaires au développement d'un médicament, l'industrie pharmaceutique a dû adopter de nouveaux outils, notamment des approches de modélisation. Ces chiffres s'expliquent par la multitude de molécules testées au début du développement avant de sélectionner la molécule adéquate. En effet, de nombreuses molécules candidates sont écartées en raison d'un manque d'efficacité, de l'apparition d'effets indésirables mais principalement à cause de propriétés pharmacocinétiques inadéquates, telles qu'une faible biodisponibilité ou un métabolisme inadapté. Ainsi, l'industrie du médicament a intégré progressivement les modèles PBPK dans son panel d'outils d'aide au développement, appuyés par l'apparition de logiciels à interface attractive. Désormais, la modélisation PBPK est intégrée pendant les différentes phases de développement d'un médicament⁸⁵ : lors de la sélection des molécules retenues (phase «*lead optimization*»), lors des études chez l'animal en phase préclinique et, plus en aval, lors des essais cliniques chez l'humain.

Lors de la phase de sélection et d'optimisation de la molécule, quelques données dont des propriétés physicochimiques des molécules sont générées *in silico* par des modèles QSAR ou *in vitro* (absorption intestinale, métabolisme hépatique, etc.). Dans ce contexte, la modélisation PBPK est utilisée comme outil intégrateur de ces données afin de fournir, très tôt dans le développement, un premier profil cinétique *in vivo* de la molécule. Cette approche ascendante («*bottom-up*»)⁸⁶ permet alors d'identifier les molécules ayant des propriétés pharmacocinétiques adaptées à l'action recherchée et de rejeter celles qui ne correspondent pas. Ainsi seul un nombre restreint de molécules poursuivra le développement et sera testé chez l'animal. Ces premiers résultats peuvent être aussi utilisés pour améliorer la structure chimique des molécules candidates et optimiser les expérimentations *in vivo* à venir.

[85] Thierry Lavé *et al.*, «Challenges and opportunities with modelling and simulation in drug discovery and drug development», *Xenobiotica*, 37(10-11), 2007, p. 1295-1310 @ ; Micaela B. Reddy *et al.*, «Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling: A Tool for Understanding ADMET Properties and Extrapolating to Human», in Sivakumar Gowder, *New Insights into Toxicity and Drug Testing*, InTech, 2013 @.

[86] François Bouzom *et al.*, «Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modelling tools: how to fit with our needs?», *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 33(2), 2012, p. 55-71 @.

Les premières études animales vont permettre de confirmer ou infirmer les cinétiques prédites lors de la phase d'optimisation. En fonction des cinétiques observées, il sera possible de raffiner le modèle PBPK si un des processus ADME était mal prédit par les données *in vitro* ou *in silico* (approche «*top-down*»). Cette étape est nécessaire pour améliorer la prédictibilité des outils utilisés en phase d'optimisation. Une fois le développement préclinique achevé, la molécule candidate est testée chez l'humain lors d'essais cliniques. Il est nécessaire d'établir la dose tolérée avant toute administration chez l'humain, puis la dose efficace. Ainsi le modèle PBPK sera couplé à un modèle d'effet (modèle pharmacodynamique ou PD) afin d'établir un lien entre la dose administrée, la concentration au niveau du site d'action et la survenue des effets thérapeutiques. Pour cela, il est nécessaire d'identifier le plus tôt possible des biomarqueurs qui permettront d'évaluer l'efficacité du médicament (marqueur de la maladie, paramètres physiologiques). Le lien entre le biomarqueur et la molécule doit être clairement identifié, facilement mesurable et extrapolable à différentes espèces. Le couplage PBPK/PD peut être aussi réalisé plus en amont (préclinique) pour évaluer, parmi plusieurs molécules candidates, la molécule la plus efficace susceptible d'aller au bout du développement. Le modèle PBPK/PD ainsi développé pourra être paramétré pour différentes populations (enfants, personnes malades avec des déficiences hépatiques ou rénales, etc.) afin d'adapter le traitement.

L'étude des interactions métaboliques bénéficie aussi de la modélisation PBPK. En effet, il est indispensable que ces interactions, sources des questions les plus fréquentes auprès des agences du médicament⁸⁷, soient identifiées très tôt car elles sont souvent rédhitratoires pour l'avenir du développement d'un composé. Pour tester la présence et l'intensité d'une interaction entre deux molécules, il est possible de coupler les modèles PBPK de chaque molécule au niveau du lieu de métabolisme avec une équation mécanistique fonction de la nature de l'interaction suspectée⁸⁸. En testant des molécules de référence avec la molécule

[87] Ping Zhao, Malcom Rowland & Shiew-Mei Huang, « Best Practice in the Use of Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling and Simulation to Address Clinical Pharmacology Regulatory Questions », *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 92(1), 2012, p. 17-20 @.

[88] Malcolm Rowland, Luc Balant & Carl Peck, « Physiologically based pharmacokinetics in drug development and regulatory science: a workshop report (Georgetown University,

en cours de développement, cette méthodologie permet d'identifier des molécules pour lesquelles l'administration simultanée d'autres médicaments serait problématique, par exemple en raison d'une absence d'effet thérapeutique ou d'apparition d'effets indésirables.

Au bout de la chaîne du développement, les autorités du médicament commencent peu à peu à reconnaître l'utilité des modèles PBPK en tant qu'outil d'aide à la compréhension des mécanismes et à la prise de décision. Les agences américaine et européenne⁸⁹ encouragent dans leurs recommandations l'utilisation de la modélisation PBPK pour comprendre les mécanismes d'interaction entre molécules et élaborer les études d'interaction, et pour étudier les cinétiques chez des populations spécifiques lorsqu'aucune étude clinique ne les a considérées. Récemment, un guide de bonnes pratiques sur la modélisation PBPK a été remis à la Food and Drug Administration afin d'uniformiser les pratiques⁹⁰.

Pour conclure, les modèles PBPK dans l'industrie pharmaceutique sont considérés comme un outil d'anticipation et d'aide à la décision permettant de réduire le nombre de candidats médicaments qui seront arrêtés au cours du développement en sélectionnant très tôt la molécule la plus susceptible d'être commercialisée. Les industriels voient aussi dans les modèles PBPK, un outil peu onéreux permettant de réduire les coûts et la longueur du développement⁹¹.

3] Conclusion

Lors des deux dernières décennies, la modélisation PBPK a su s'intégrer en toxicologie et en pharmacologie et commence à être approuvée par les autorités régulatrices. Ces dernières années, la

Washington, DC, May 29-30, 2002)», *AAPS pharmSci*, 6(1), 2004, p. E6-E6 @ ; Nathalie Perdaems *et al.*, « Predictions of Metabolic Drug-Drug Interactions Using Physiologically Based Modelling Two Cytochrome P450 3A4 Substrates Coadministered with Ketoconazole or Verapamil », *Clinical Pharmacokinetics*, 49(4), 2010, p. 239-258 @.

[89] Respectivement : Food and Drug Administration, *Guidance for Industry: Drug Interaction Studies – Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations*, Silver Spring, MD, 2012 @ ; European Medicines Agency (EMA), *Guideline on the investigation of drug interactions*, London, UK.CPMP/EWP/560/95/Rev., 2012 @.

[90] Zhao *et al.*, *op. cit.*, 2012.

[91] Peters, *op. cit.*, 2012.

nature et la quantité des données disponibles pour calibrer un modèle PBPK ont grandement évolué, passant de données macroscopiques au niveau de l'individu à des données de plus en plus précises sur les mécanismes obtenues par des techniques *in vitro* ou par l'analyse de données de type «omiques»⁹². En particulier, la métabolomique permet de quantifier les concentrations intra- et extracellulaires des métabolites et de générer des profils métaboliques qui peuvent être couplés à un modèle PBPK⁹³. Le défi pour la modélisation PBPK est donc d'évoluer afin de continuer à être un outil de référence pour l'intégration des connaissances sur le devenir des substances dans un organisme vivant. En particulier, une meilleure caractérisation de l'organisation et de l'activité cellulaire au sein des organes est possible avec des techniques d'imagerie médicale permettant l'acquisition d'images 3D sur la morphologie des organes et aussi sur la distribution des substances (tels que des agents de contraste)⁹⁴. Cela permettrait d'affiner la description de l'organisme et de modéliser au sein même des organes plusieurs zones avec des activités biologiques différentes. Une autre voie de développement est le couplage de la modélisation PBPK avec des systèmes *in vitro* «humain-sur-puce» (*human-on-chip*), c'est-à-dire des dispositifs de perfusion. Ces systèmes proposent de cultiver plusieurs types cellulaires correspondant à des organes d'intérêt (foie, intestins, etc.) dans des chambres de culture séparées et reliées entre elles par un fluide circulant. L'objectif ici est de reproduire un maximum de processus ADME au sein du même dispositif afin de reproduire les interactions entre les différents organes⁹⁵.

[92] Markus Krauss *et al.*, « Integrating Cellular Metabolism into a Multiscale Whole-Body Model », *Plos Computational Biology*, 8(10), 2012 @.

[93] Markus Krauss *et al.*, « Integrating Cellular Metabolism into a Multiscale Whole-Body Model », *Plos Computational Biology*, 8(10), 2012 @.

[94] Céline Brochet *et al.*, « Evaluation of antiangiogenic treatment effects on tumors' microcirculation by Bayesian physiological pharmacokinetic modeling and magnetic resonance imaging », *Magnetic Resonance Imaging*, 24(8), 2006, p. 1059-1067 @ ; Li Yan *et al.*, « Modeling and simulation of hepatic drug disposition using a physiologically based, multi-agent in silico liver », *Pharmaceutical Research*, 25(5), 2008, p. 1023-1036 @.

[95] Jong H. Sung, Carrie Kam & Michael L. Shuler, « A microfluidic device for a pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) model on a chip », *Lab on a Chip*, 10(4), 2010, p. 446-455 @ ; Djomangan A. Ouattara *et al.*, « Kinetic modelling of in vitro cell-based assays to characterize non-specific bindings and ADME processes in a static and a perfused fluidic system », *Toxicology Letters*, 205(3), 2011, p. 310-319 @.

Différents obstacles empêchent une utilisation plus large des approches de modélisation telles que les modèles PBPK. Peuvent être cités un manque d'uniformisation des modèles, des bases de données ou des logiciels utilisés, mais surtout un manque de formation des chercheurs ou experts à ces modèles⁹⁶. Cependant, l'utilisation des modèles PBPK pourrait réduire les expérimentations animales et donc les coûts financiers et éthiques liés à de telles études tout en gardant un niveau de confiance similaire par rapport aux résultats obtenus par expérimentations animales *in vivo*.

Epreuves auteur

[96] Bouzom *et al.*, *op. cit.*, 2012 ; Lavé *et al.*, *op. cit.*, 2007.

Annexe C. Valorisation des travaux

- **Communications écrites**

Determination of *cis*, *trans*-permethrin and associated metabolites in rat blood and organs by gas chromatography ion trap spectrometry

Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2014 May; 406(14):3477-87.

F. LESTREMAU, M.-E. WILLEMIN, C. CHATELLIER, S. DESMOTS, C. BROCHOT

Development of a rat PBPK model of *cis* and *trans*-permethrin and theirs metabolites *cis* or *trans*-DCCA, 3-PBA and 4'-OH-PBA.

Sera soumis à *Toxicology Applied Pharmacology*

M.-E. WILLEMIN, S. DESMOTS, F. LESTREMAU, E. LECLERC, C. MOESCH, C. BROCHOT

***In vitro* human determination of metabolism of permethrin isomers alone or as a mixture and the formation of the major metabolites in cryopreserved primary hepatocytes**

Soumis à *Toxicology in vitro*

M.-E. WILLEMIN, A. KADAR, G. DE SOUSA, E. LECLERC, R. RAHMANI, C. BROCHOT

- **Chapitre de livre**

La modélisation toxico/pharmacocinétique à fondement physiologique : son rôle en évaluation du risque et en pharmacologie

Modéliser et Simuler Tome 2 (Editions Matériologiques). Novembre 2014.

C. BROCHOT, M.-E. WILLEMIN, F. ZEMAN.

- **Communications orales**

Development of an *in vivo*, *in vitro* and *in silico* approach to predict the toxicokinetic of pyrethroids mixture in humans

(Journée du GMP, Paris, 2013) – **Prix du meilleur poster**

M.-E. WILLEMIN, S. DESMOTS, F. LESTREMAU, C. MOESCH, C. BROCHOT

Développement d'un modèle toxicocinétique de la *cis* et *trans*-perméthrine et ses métabolites chez le rat

(5^{ème} journées internationales de Toxicologie, Liège, 2013)

M.-E. WILLEMIN, S. DESMOTS, R. LE GRAND, F. ZEMAN, F. LESTREMAU, C. MOESCH, C. BROCHOT

Développement d'un modèle toxicocinétique de la *cis* et *trans*-perméthrine et ses métabolites chez le rat

(Association pour la recherche en Toxicologie, Paris, 2013)

M.-E. WILLEMIN, F. ROBIDEL, A. LECOMTE, C. CHATELLIER, R. LE GRAND, F. ZEMAN, F. LESTREMAU, S. DESMOTS, C. MOESCH, C. BROCHOT

- **Communication affichée**

***In vitro* metabolism of permethrin and two metabolites by human primary hepatocytes**

(Eurotox, Edimbourg, 2014)

M.-E. WILLEMIN, A. KADAR, G. DE SOUSA, E. LECLERC, R. RAHMANI, C. BROCHOT

RESUME

Les pyréthriinoïdes sont des insecticides auxquels la population est quotidiennement exposée. Le composé parent est suspecté d'induire des perturbations neuronales et hormonales chez l'homme. Au sein de cette famille, la perméthrine (mélange d'isomère *cis* et *trans*) est le composé le plus utilisé dans le traitement des intérieurs de maison. Dans ce travail de thèse, nous proposons de développer un modèle PBPK pour la perméthrine et certains de ses métabolites urinaires, utilisés comme biomarqueurs d'exposition, et d'évaluer les interactions métaboliques des deux isomères. Trois étapes ont été suivies. Une méthode analytique par GC-MS/MS a été développée pour doser simultanément les composés dans les différentes matrices. Un modèle PBPK de la perméthrine chez le rat a été associé à un modèles PBPK réduit du DCCA et empirique du 4'-OH-PBA et du 3-PBA. Les paramètres toxicocinétiques de chaque composé ont été estimés dans un cadre Bayésien à partir d'expériences *in vivo* menées à la dose orale de 25 mg/kg de *cis*- ou *trans*-perméthrine chez le rat. Le modèle PBPK de la perméthrine a été vérifié sur des données de cinétique d'un mélange *cis/trans*. Le métabolisme hépatique de chaque composé a été quantifié chez l'homme sur des hépatocytes primaires dans des conditions optimales pour l'extrapolation *in vitro-in vivo*, en incubant les isomères séparément et en mélange. Ce travail de thèse souligne la possibilité d'établir un modèle PBPK générique pour les pyréthriinoïdes. L'absence d'interaction entre les isomères au niveau *in vitro* et lors de la vérification du modèle PBPK de la perméthrine pourrait simplifier la caractérisation de l'exposition à un mélange de pyréthriinoïdes.

MOTS-CLES

Modèle pharmacocinétique basé sur la physiologie

Métabolisme *in vitro*

Extrapolation *in vitro-in vivo*

Acide 3-phénoxybenzoïque

Acide 3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-diméthylcyclopropane carboxylique

Perméthrine

Evaluation du risque

Méthode d'analyse

Interaction métabolique