

UNIVERSITÉ DE LIMOGES
FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNÉE 2014

THÈSE N°

DOSAGE MULTI-RÉSIDUS DE PRODUITS PHYTOSANITAIRES
DANS LE POLLEN RÉCOLTÉ PAR LES ABEILLES

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement
le 24 janvier 2014
par

Stephan GABET
Né le 7 novembre 1984, à Calais

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

Professeur Christian MÆSCH.....Président et Directeur de thèse
Docteur Dominique CLÉDAT.....Juge
Docteur Isabelle RAYNAL.....Juge

UNIVERSITÉ DE LIMOGES
FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNÉE 2014

THÈSE N°

DOSAGE MULTI-RÉSIDUS DE PRODUITS PHYTOSANITAIRES
DANS LE POLLEN RÉCOLTÉ PAR LES ABEILLES

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement
le 24 janvier 2014
par

Stephan GABET
Né le 7 novembre 1984, à Calais

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

Professeur Christian MÆSCH.....Président et Directeur de thèse
Docteur Dominique CLÉDAT.....Juge
Docteur Isabelle RAYNAL.....Juge

Enseignants de la Faculté de Pharmacie



Au 05.11.2013

DOYEN DE LA FACULTÉ : Monsieur le Professeur Jean-Luc **DUROUX**
1^{er} VICE-DOYEN : Madame Catherine **FAGNÈRE**, Maître de Conférences
2^{ème} VICE-DOYEN : Monsieur le Professeur Serge **BATTU**

PROFESSEURS :

BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE
BENEYTOU Jean-Louis	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
BOTINEAU Michel	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
BROSSARD Claude	PHARMACOTECHNIE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
DELAGE Christiane	CHIMIE GÉNÉRALE ET MINÉRALE
DESMOULIÈRE Alexis	PHYSIOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	BIOPHYSIQUE, BIOMATHÉMATIQUES ET INFORMATIQUE
MAMBU Lengo	PHARMACOGNOSIE
ROUSSEAU Annick	BIOSTATISTIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS – PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

LACHÂTRE Gérard	TOXICOLOGIE
MÆSCH Christian	HYGIÈNE HYDROLOGIE ENVIRONNEMENT
ROGEZ Sylvie	BACTÉRIOLOGIE ET VIROLOGIE

MAÎTRE DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS – PRATICIEN HOSPITALIER DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES : (en détachement)

PICARD Nicolas

PHARMACOLOGIE

MAÎTRES DE CONFÉRENCES :

BASLY Jean-Philippe

CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

BEAUBRUN-GIRY Karine

PHARMACOTECHNIE

BILLET Fabrice

PHYSIOLOGIE

CALLISTE Claude

BIOPHYSIQUE, BIOMATHÉMATIQUES
ET INFORMATIQUE

CLÉDAT Dominique

CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

COMBY Francis

CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE

COURTIOUX Bertrand

PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE

DELEBASSÉE Sylvie

MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-
IMMUNOLOGIE

DEMIOT Claire-Elise

PHARMACOLOGIE

FAGNÈRE Catherine

CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE

FROISSARD Didier

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE

JAMBUT Anne-Catherine

CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE

LABROUSSE Pascal

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE

LÉGER David

BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

LIAGRE Bertrand

BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

MARION-THORE Sandrine

CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE

MARRE-FOURNIER Françoise

BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

MILLOT Marion

PHARMACOGNOSIE

MOREAU Jeanne

MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-
IMMUNOLOGIE

PASCAUD Patricia

PHARMACIE GALÉNIQUE

POUGET Christelle

CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE

SIMON Alain

CHIMIE GÉNÉRALE ET MINÉRALE

TROUILLAS Patrick

BIOPHYSIQUE, BIOMATHÉMATIQUES
ET INFORMATIQUE

VIGNOLES Philippe

BIOPHYSIQUE, BIOMATHÉMATIQUES
ET INFORMATIQUE

PROFESSEUR de LYCEE PROFESSIONNEL :

ROUMIEUX Gwenhaël

ANGLAIS

ATTACHÉ TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE :

MAMMARI Nour (1/10/13 au 31/08/14)

MICROBIOLOGIE

VEDRENNE Nicolas (1/11/13 au 31/08/14)

CHIMIE ANALYTIQUE

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Christian MÆSCH,

Professeur d'Hygiène, Hydrologie et Environnement à la Faculté de Pharmacie de Limoges et Praticien Hospitalier responsable de l'Unité Fonctionnelle de Toxicologie analytique environnementale et de Santé au travail (UF 8880) du CHU de Limoges, qui fut mon Directeur de thèse et qui me fit l'honneur de présider ce jury.

Je souhaite également lui témoigner toute ma gratitude pour ses conseils et pour l'attention qu'il m'a accordée. Enfin, je le remercie pour m'avoir accordé son soutien pour ma formation en Santé Publique et pour les nombreuses discussions enrichissantes partagées ensemble.

Je remercie également le Docteur Dominique CLÉDAT,

Maître de conférences de Chimie Analytique et Bromatologie à la Faculté de Pharmacie de Limoges, pour l'intérêt qu'elle a porté à mon travail et pour l'honneur qu'elle m'a accordé en acceptant de le juger.

Je remercie tout autant le Docteur Isabelle RAYNAL,

Pharmacien titulaire d'officine à Limoges, pour l'honneur qu'elle m'a accordé en acceptant de juger mon travail. Je la remercie également pour la confiance qu'elle m'a témoignée à maintes reprises dans le cadre professionnel.

Ensuite, je remercie Monsieur Guillaume LAUTHIER,

Technicien de l'Unité Fonctionnelle de Toxicologie analytique environnementale et de Santé au travail (UF 8880) du CHU de Limoges, pour ses conseils et sa disponibilité.

J'en profite pour saluer toute l'équipe du laboratoire de Pharmacologie, Toxicologie et Pharmacovigilance pour sa sympathie et pour m'avoir accepté en son sein le temps des expérimentations.

Je remercie mes parents, Claudine et André,

pour m'avoir toujours soutenu dans mes choix. Je leur suis profondément reconnaissant pour tout ce qu'ils m'ont offert, m'ont permis, m'ont interdit, m'ont fait découvrir ou m'ont inculqué.

Enfin, je remercie tous ceux et celles,

que j'ai eu la chance de rencontrer pendant mes études et qui au fil du temps, des rires et des calembours, sont devenus des êtres chers. Je les remercie pour tous ces moments de bonheur partagés et à venir.

Sommaire

Enseignants de la Faculté de Pharmacie.....	2
Remerciements.....	5
Liste des abréviations.....	9
Introduction générale.....	11
PREMIÈRE PARTIE : GÉNÉRALITÉS.....	13
Entrée en matière.....	14
Présentation des pesticides.....	19
Marché des pesticides.....	28
Synthèse.....	38
SECONDE PARTIE : EXTRACTION ET DOSAGE DE RÉSIDUS DE PRODUITS	
PHYTOSANITAIRES DANS LE POLLEN.....	40
État de l'art.....	41
Matériels et méthodes.....	63
Résultats.....	74
Discussion.....	77
Conclusion générale.....	98
Bibliographie.....	101
ANNEXES.....	111
Annexe I Détail des molécules extraites des pollens.....	112
Annexe II Modalités de prélèvement des pollens.....	114
Table des matières.....	116
Index des illustrations.....	119
Index des tableaux.....	120
Serment de Galien.....	121

Liste des abréviations

2,4-D : acide 2,4-dichlorophénoxyacétique

ADALim : Association pour le développement de l'apiculture en Limousin

ASE Dionex® : *accelerated solvent extraction by Dionex®*

ATP : adénosine triphosphate

CARI : Centre apicole de recherche et d'information

CCD : *colony collapse disorder*

CE : Communauté européenne

CEE : Communauté économique européenne

CHU : centre hospitalier universitaire

CL : chromatographie liquide

CL/SM-SM : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

CPG : chromatographie en phase gazeuse

CPG/SM : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

DDT : dichlorodiphényltrichloroéthane

ECPA : *European crop protection association*

EI : *electron ionization*

EPSPS : 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthétase

FAO : *Food and agriculture organization*

FAOSTAT : *database of Food and agriculture organization*

FSOT : *fused-silica open tubular*

g-HCH : *gamma*-hexachlorocyclohexane (= lindane)

GABA : *gamma-aminobutyric acid*

GCB : *graphitized carbon*

GPC : *gel permeation chromatography*

HLB : *hydrophilic-lipophilic balance*

HPLC : *high performance liquid chromatography*

IBS : inhibiteurs de la biosynthèse des stérols
LDD : limite de détection
LDQ : limite de quantification
LLE : *liquid-liquid extraction*
MRL : *maximum residue limits*
MSPD : *matrix solid-phase dispersion*
ODS : *octa decyl silica* (= C18)
OMS : Organisation mondiale de la santé
ORP : Observatoire des résidus de pesticides
PAC : politique agricole commune
PLE : *pressurized liquid extraction*
PSA : *primary and secondary amine exchange material*
QuEChERS : « *quick, easy, cheap, effective, rugged & safe* »
SAU : surface agricole utile
SDHI : *succinate deshydrogenase inhibitors*
SEC : *size exclusion chromatography*
SIM : *selected ion monitoring*
SPE : *solid-phase extraction*
UE : Union européenne
UIPP : Union des industries de la protection des plantes
USA : *United States of America*

Introduction générale

Les apiculteurs font face depuis une quinzaine d'années à une baisse, mondiale et parfois critique, de la population des colonies d'abeilles domestiques (*Apis mellifera* L.). Plusieurs facteurs pouvant expliquer ce phénomène ont été identifiés, et parmi ceux-ci sont notamment incriminés les produits phytopharmaceutiques.

Sont dénoncés plus particulièrement ceux présentant des propriétés insecticides, auxquels les abeilles sont susceptibles d'être exposées lors du butinage des fleurs traitées par ces substances. En effet, au regard des études toxicologiques, ces produits seraient responsables d'effets délétères chez les pollinisateurs tels que l'abeille domestique ou le bourdon.

Les pollinisateurs ne s'attaquant pas aux végétaux et les traitements phytosanitaires étant interdits pendant la floraison, ils ne sont pas une cible directe des insecticides employés. Néanmoins, par persistance et migration des principes actifs au travers des tissus végétaux vers le nectar et le pollen, ils peuvent y être exposés lors du butinage.

Le dosage des résidus de produits phytosanitaires contenus dans le pollen, récolté par les abeilles lors du butinage puis amené à la ruche comme principale source d'alimentation pour la colonie, permet l'évaluation des expositions aiguës et chroniques à ces composés chimiques. Ces données peuvent ensuite être mises en relation avec la survenue de troubles, létaux ou sublétaux, chez les insectes sus-cités.

En outre, le pollen, en tant que produit d'apiculture destiné à la consommation humaine, peut également être une source d'exposition par voie digestive aux produits phytosanitaires pour l'être humain.

La force d'un dosage multi-résidus repose sur sa capacité à couvrir un large spectre de substances en une seule analyse. Ainsi, il constitue un outil intéressant dans l'évaluation de l'exposition aux produits phytosanitaires.

Or, la littérature scientifique traitant de l'expérimentation d'un tel dosage de résidus de pesticides dans le pollen se révèle lacunaire. De plus, par sa richesse en lipides et en pigments et sa forte teneur en humidité, le pollen s'avère complexe à analyser. Par conséquent, des protocoles adaptés aux spécificités de cette matrice d'étude nécessitent d'être développés.

Cette thèse, composée de deux parties, s'inscrit dans cette démarche.

La première partie de cette thèse est dédiée à l'introduction du sujet et à la présentation des pesticides. L'objectif est de mesurer l'importance que ces substances chimiques ont prise au fil du temps dans différents secteurs, qu'ils soient agricoles ou non, et à diverses échelles, qu'elles soient nationales ou mondiales.

Cette première partie, introductive et générale, est divisée en trois sections. Une entrée en matière permettra de définir la sphère des pesticides et d'aborder les aspects réglementaires. Puis suivra une présentation des produits phytosanitaires avec un historique et un détail des classes majeures existantes. Enfin un état des lieux du marché des produits phytopharmaceutiques permettra de clore cette première partie.

La seconde partie est consacrée au dosage des produits phytosanitaires dans le pollen. La faisabilité d'un dosage multi-résidus au sein de cette matrice est appréciée au travers d'une revue de la littérature et de l'expérimentation de deux méthodes d'extraction sur quelques échantillons de pollen.

Cette seconde partie est constituée de quatre sections distinctes. Seront premièrement présentés les dosages de pesticides réalisés dans le pollen lors de précédentes études scientifiques. Cette revue de la littérature permettra de mettre en avant les spécificités expérimentales des différentes publications recensées. Puis seront détaillés les protocoles appliqués lors des dosages multi-résidus réalisés dans le cadre de cette thèse d'exercice. Ensuite, les limites analytiques atteintes lors de la mise en œuvre des deux méthodes d'extraction seront comparées et les résultats ainsi obtenus seront présentés. Au travers de la dernière section, les choix méthodologiques ainsi que les résultats seront discutés au regard des données disponibles dans la littérature. Les risques sanitaires et environnementaux liés à l'exposition aux résidus de produits phytosanitaires dans les pollens seront également avancés.

PREMIÈRE PARTIE

GÉNÉRALITÉS

Entrée en matière

1. Préambule

L'homme préhistorique, conjointement à sa sédentarisation, ne chercha plus à quérir sa nourriture au jour le jour mais à assurer son alimentation par l'agriculture et le stockage annuel des céréales cultivées. Avec le travail de la terre, il dut apprendre à maîtriser cet art afin de garantir la récolte nécessaire à sa survie.

Il s'agit là sans doute de l'une des plus grandes évolutions de l'humanité. La réussite de cette entreprise nécessitait bien des efforts et du temps. Elle reposait sur le développement et l'expérimentation de techniques agricoles, l'invention de nouveaux outils, la fertilisation des terres et la lutte contre les ennemis des cultures.

Le recours aux techniques d'enrichissement du sol semble aussi ancien que l'agriculture elle-même (Mésopotamie, environ 8000 av. JC).

Initialement, on apportait à la terre uniquement des nutriments organiques par épandages de déjections animales, de fumier provenant des étables et des fosses d'aisance. Dans le même esprit, de nos jours, on peut adjoindre aux terres cultivées les boues valorisées issues des stations d'épuration des eaux (Denhez, 2011).

Cependant, il faudra attendre les principes du chimiste allemand Liebig (1803–1873) pour que l'on s'intéresse à l'apport minéral – NPK : azote, phosphore et potassium – jugé dès lors préférable. Les engrais chimiques font ainsi leur apparition autour de 1880. Des quantités toujours plus importantes de ces fertilisants furent mêlées aux terres cultivées : à titre d'exemple, en France, elles étaient de l'ordre de la dizaine de kilogrammes par hectare et par an aux débuts du postulat contre trois cents kilogrammes par hectare et par an en l'espace d'un siècle (Testud et Grillet, 2007).

Parallèlement en matière de rentabilité, la productivité agricole s'envole : pour ce qui est de la moyenne nationale française, le rendement du blé à l'hectare fut multiplié par sept entre 1850 et 2005. Le bénéfice majeur de cette évolution fut atteint lorsque, après de nombreux épisodes de famine s'égrainant du Haut Moyen-Age au XIX^{ème} siècle, le déficit céréalier de l'Europe Occidentale fut enfin compensé en 1983 (Testud et Grillet, 2007). L'abondance alimentaire dont jouit l'Europe Occidentale aujourd'hui est donc un phénomène relativement récent.

Si la mise à profit de la chimie pour la fertilisation des sols a activement collaboré à l'amélioration de la productivité agricole, ce ne fut en aucun cas son unique champ d'application. Effectivement, l'augmentation des récoltes nécessite une action double : d'une part augmenter la production et d'autre part diminuer les pertes.

C'est à cet échelon que la chimie entre une seconde fois en scène pour jouer un rôle primordial dans la lutte contre les ennemis des cultures, lutte dont les pesticides sont les acteurs principaux.

2. Définition du sujet

Dans un premier temps, commençons simplement par définir ce que l'on entend par « pesticide ». L'Encyclopédie Larousse propose les définitions suivantes :

- « *Adjectif et nom masculin. Se dit d'un produit chimique utilisé pour la protection ou le traitement des végétaux* » ;
- « *Produit minéral ou organique destiné à protéger hommes, animaux ou végétaux contre divers fléaux (germes, parasites, animaux nuisibles) en les détruisant* ».

Pour ce qui est de l'étymologie, il est précisé que « pesticide » est construit à partir de l'anglais *pest* (parasite, nuisible) venant lui-même du latin *pestis, -is, f.* (nuisible, fléau) auquel a été ajouté le suffixe *-cide* du verbe latin *caedo, caedere* (tuer) (Encyclopédie Larousse, « Pesticide »).

Afin de délimiter le cadre juridique des pesticides, les textes du droit communautaire posent une définition plus approfondie. En reprenant la

terminologie proposée par l'article 2 de la Directive 91/414/CEE concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques, il est précisé qu'il faut entendre par « produits phytopharmaceutiques » les substances actives – ou les préparations contenant une ou plusieurs substances actives – destinées à (Conseil des CE, 1991) :

- protéger les végétaux ou les produits végétaux contre tous les organismes nuisibles ou à prévenir leur action ;
- exercer une action sur les processus vitaux des végétaux, pour autant qu'il ne s'agisse pas de substances nutritives ;
- assurer la conservation des produits végétaux ;
- détruire les végétaux indésirables ;
- ou détruire les parties de végétaux, freiner ou prévenir une croissance indésirable des végétaux. »

Par interprétation du premier alinéa de cet extrait, sont donc considérées comme « produits phytopharmaceutiques » les préparations utilisées lors des épandages dans le cadre de la lutte contre les ennemis des cultures et des récoltes. Et sont également entendus comme tels selon les dispositions :

- du second alinéa : les hormones de croissance végétale, les stimulateurs utiles à la parthénocarpie ;
- des premier et troisième alinéas : les substances préconisées pour le traitement des semences, des récoltes ;
- du quatrième alinéa : les désherbants, quel que soit leur domaine d'utilisation : professionnelle ou particulière, publique ou privée ;
- du dernier alinéa : les agents freinant la chute précoce des fruits.

Cependant, le troisième alinéa n'inclut pas les agents conservateurs, qui font l'objet d'une réglementation particulière. Les appellations « phytomédicament » et « produit phytosanitaire », également rencontrées, sont des synonymes de « produit phytopharmaceutique » (Cottard et Pajon, 2010).

Par ailleurs, bien que ces deux mots soient indifféremment employés, le terme vulgarisé « pesticide » possède un sens plus large que l'appellation réglementaire « produit phytosanitaire » (Actu-Environnement, « Définition de pesticide »). Les « pesticides » englobent ces derniers mais incluent également

des molécules entrant dans la composition de préparations à usage vétérinaire (traitement des aliments pour animaux, imprégnation des colliers anti-puces, anti-parasitaires, ...) ou assurant la protection de l'environnement humain contre tous les organismes vivants jugés nuisibles (diffuseurs anti-moustiques, anti-parasitaires de logis, ...).

Sur ce dernier point, l'article 2 de la Directive 98/8/CE concernant la mise sur le marché des produits biocides apporte quelques informations complémentaires (Parlement Européen et Conseil de l'UE, 1998) :

« On entend par organisme nuisible tout organisme dont la présence n'est pas souhaitée ou qui produit un effet nocif pour l'homme, ses activités ou les produits qu'il utilise ou produit, ou pour les animaux ou pour l'environnement. »

Cette définition confirme bien l'ouverture du champ d'application des pesticides en comparaison de l'emploi spécifique des produits phytopharmaceutiques, consacrés à la protection des végétaux par les moyens précédemment cités.

A noter que plusieurs catégories de pesticides ont été déterminées en fonction de leurs cibles : insecticides, fongicides, herbicides, molluscicides, nématocides, etc...

Pour aller plus loin, la même directive 98/8/CE avance une autre notion (Parlement Européen et Conseil de l'UE, 1998) :

« On entend par produits biocides les substances actives et les préparations contenant une ou plusieurs substances actives [...] qui sont destinées à détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles, à en prévenir l'action ou à les combattre de toute autre manière, par une action chimique ou biologique. »

Ainsi, le terme « biocide » désigne tout à la fois des substances chimiques appartenant à la famille des produits phytopharmaceutiques mais également d'autres molécules n'entrant dans aucune de ces deux catégories telles que les antibiotiques à usage médical ou vétérinaire ou encore les désinfectants de l'eau, de l'air ou des surfaces.

Une même substance – ou préparation de substances – peut donc être régie par plusieurs législations à cause du chevauchement des cadres de ces dernières. Dans un tel cas, c'est toujours la législation la plus spécifique qui détient la primeur sur celle la plus générale. Pour exemple, un antibiotique utilisé à des fins thérapeutiques humaines, tout en étant un biocide, sera soumis à la législation du médicament.

Pour conclure, l'illustration 1 recense les termes déjà expliqués mais évoque également un sujet pas encore abordé jusqu'ici : la persistance dans l'environnement des substances épandues. L'article 2 de la Directive 91/414/CEE traite de ce problème et définit les nommés « résidus de produits phytopharmaceutiques » comme tels (Conseil des CE, 1991) :

« Une ou plusieurs substances présentes dans ou sur des végétaux ou produits d'origine végétale, des produits comestibles d'origine animale, ou ailleurs dans l'environnement, et constituant le reliquat de l'emploi d'un produit phytopharmaceutique, y compris leurs métabolites et produits issus de la dégradation ou de la réaction. »

Les résidus d'un produit phytosanitaire (et de ses métabolites) dont l'usage est abandonné peuvent donc être trouvés dans l'environnement. La persistance d'un composé chimique dans un compartiment environnemental est liée à son temps de demi-vie dans ce compartiment.

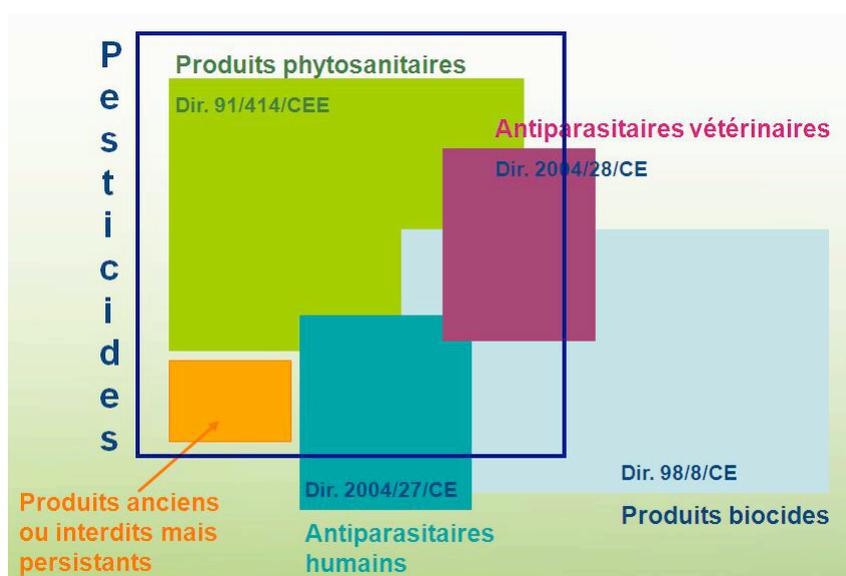


Illustration 1 : Présentation des différentes classes
(Source : ORP, « Les Pesticides : Introduction »)

Présentation des pesticides

1. Historique

L'utilisation de pesticides par l'homme semble remonter aussi loin que son histoire. Avec le développement de l'agriculture, l'homme apprit à cultiver les denrées nécessaires à sa survie mais il dut également faire face aux nombreux fléaux (oiseaux, rongeurs, insectes, mollusques, moisissures, etc...) qui compromettaient le rendement des récoltes et leur conservation dans les greniers (Testud et Grillet, 2007).

Ainsi des écrits sumériens relatent une utilisation commune du soufre dans les plantations d'épeautre sur les bords de l'Euphrate et du Tigre (site de l'Irak actuel) afin d'en préserver les grains des dépréciations dues aux attaques fongiques, ceci dès le troisième millénaire avant notre ère, usage qui perdure encore de nos jours.

L'emploi d'éléments chimiques naturels s'est constamment intensifié et diversifié, de l'antiquité au XIX^{ème} siècle.

Dès l'Empire romain, l'arsenic est recommandé comme insecticide par les naturalistes tels que Pline (I^{er} siècle après JC). Plus tard, au XIX^{ème}, il est préconisé contre le doryphore de la pomme de terre sur le continent américain. Son usage phytosanitaire a été interdit dans les années cinquante devant la toxicité devenue évidente des sels d'arsenic (Fournier, 2007).

Au Moyen-âge, de nombreuses préparations furent établies dans la lutte pour la préservation des cultures, comme en témoigne *Le Traité des Poisons* de Maïmonide (XII^{ème} siècle). Par exemple, des extraits d'aconit étaient préconisés contre les rongeurs.

Plus tard, au XV^{ème} siècle, des sels minéraux, à base de plomb ou de mercure notamment, vinrent compléter la liste des pesticides. On en fit usage à travers tout l'Ancien Monde, de l'Europe à la Chine, par dispersion directe sur les cultures ou pour le traitement des semences (ORP, « Les pesticides :

Historique »). Ces méthodes à gros risques, sanitaire et environnemental, furent encore appliquées au début du siècle dernier.

À la fin du XVII^{ème} siècle les propriétés insecticides de la nicotine, obtenue par décoction de feuilles de tabac, furent découvertes en France (Fournier, 2007). Cette molécule naturelle tomba en désuétude au milieu du XX^{ème} siècle avec le développement de la chimie organique et des produits de synthèse. De plus la nicotine, lipophile donc absorbable par voie trans-cutanée, n'était pas sans risques dans son usage phytopharmaceutique : des cas de syndromes cholinergiques furent recensés (Saïssy et Rüttimeann, 1999).

Toujours dans le registre des molécules naturelles, le XIX^{ème} siècle vit la découverte de deux nouveaux pesticides : la pyrèthrine et la roténone (ORP, « Les pesticides : Historique »).

La pyrèthrine, tirant son nom du pyrèthre dont elle est extraite, présentait l'avantage de combattre les animaux à sang froid (insectes, araignées, mollusques, ...) tout en préservant les animaux à sang chaud (Ware et Whitacre, 2004).

La roténone, retrouvée dans certaines légumineuses tropicales telles que le derris ou le lonchocarpus dont les jardiniers d'Amérique du Sud utilisaient les racines, était reconnue pour ses propriétés insecticides. Cependant une corrélation a été établie entre l'utilisation de roténone par les professionnels agricoles et une augmentation significative de cas de maladie de Parkinson au sein de cette population (Tanner *et al.*, 2011). Finalement, une décision du 30 avril 2008 de la Commission Européenne a interdit aux états membres la commercialisation et l'utilisation de spécialités phytopharmaceutiques en renfermant.

Le XIX^{ème} siècle vit le développement de la chimie minérale et plus particulièrement des pesticides à base de cuivre (ORP, « Les pesticides : Historique »).

Les sels de cuivre, tant herbicides que fongicides, se multiplient dans la lutte contre les invasions fongiques de la vigne et de la pomme de terre. Pour exemple, on peut citer la bouillie bordelaise, mélange de sulfate de cuivre et

de chaux, conçue en 1880. Elle est communément épanchée de nos jours mais n'est pas dénuée de risques pour l'environnement. En effet, le cuivre, non dégradé, tend au fil des années à s'accumuler dans les sols des parcelles où l'on y a recours et représente un réel danger tant pour la faune des sols ou que pour la flore (Alix *et al.*, 2005).

Au début XX^{ème} siècle, on avait donc déjà établi un large panel de pesticides. Mais ce furent réellement les années trente qui marquèrent l'entrée dans l'ère des pesticides, par la mise à profit du développement de la chimie organique et des recherches faites sur les armes chimiques pendant la première guerre mondiale (ORP, « Les pesticides : Historique »). Dès lors, on vit apparaître de nombreuses classes de pesticides qui vinrent supplanter les plus anciennes.

En 1939, en reprenant les travaux sur la synthèse du dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) menés par Zeidler en 1874, le chimiste suisse Paul Müller en démontra le pouvoir insecticide puissant, ce qui lui valut le Prix Nobel de médecine en 1948. Commercialisé dès 1943, il devint rapidement le pesticide le plus utilisé au monde.

Cependant le DDT fut controversé dans les années 60 aux Etats-Unis puis dans le monde entier : plusieurs rapports révélaient un lien de causalité entre ce dernier et une mise en péril de la biodiversité par un phénomène de bioamplification (Clear Lake, Californie, USA ; 1956). Les attaques menées par divers mouvements écologistes aboutirent à une réévaluation des risques encourus par son utilisation et progressivement à son interdiction dans les pays développés dans les années soixante-dix (Carson, 1962). Sur le plan humain, malgré une apparente innocuité en terme de toxicité aiguë, des études ultérieures incriminèrent le DDT sur son caractère potentiellement cancérigène, ainsi que sur une diminution de la fécondité et une augmentation des naissances prématurées chez les populations exposées (Longnecker *et al.*, 2001). Aujourd'hui le DDT est totalement interdit de production, de commercialisation et d'utilisation dans la majeure partie des états du monde. Ceci dit, depuis 2006, l'OMS a de nouveau octroyé un permis de production et d'utilisation dans plusieurs pays en voie de développement dans le cadre de l'éradication des moustiques et des autres vecteurs de maladies tropicales telles que le paludisme (Denhez, 2011).

5000 ans d'histoire ont ainsi été parcourus depuis l'utilisation empirique de substances naturelles, marquant les prémices de la lutte contre les ennemis des cultures, à l'élaboration par voie de synthèse de produits chimiques.

2. Différentes classes

Pendant la seconde guerre mondiale, dans leur course à l'armement, les nations rivales investirent beaucoup de moyens dans les domaines de l'ingénierie et des sciences : c'est à cette période que la chimie organique connut un second grand pas. La recherche civile tira bénéfice des recherches menées à but militaire et on développa ainsi plusieurs nouvelles familles de pesticides synthétiques.

La mise au point de nouveaux produits phytopharmaceutiques se poursuit depuis lors ; de nouvelles classes de pesticides ne cessent d'être développées, venant étoffer une gamme de plus en plus large (Tableau 1).

Tableau 1 : Principaux produits phytopharmaceutiques, triés par classes et par décennie d'apparition

(Source : El Mrabet et Charlet, 2008)

	Herbicides	Fongicides	Insecticides
Années 40	Phytohormones		Organochlorés Organophosphorés
Années 50	Urées substituées Triazines	Thiocarbamates Dithiocarbamates	Carbamates
Années 60	Ammoniums quaternaires	Benzimidazoles	
Années 70	Glyphosate	Triazoles	Pyréthrinoïdes Benzoylurées
Années 80	Sulfonylurées		
Années 90		Anilinopyrimidines Strobilurines	Néonicotinoïdes
Années 2000		Carboxamides	

2.1. Herbicides

Les **phytohormones** ont fait leur apparition dans les années quarante avec la synthèse de l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D). Ce composé auxinomimétique[◊] fut le premier herbicide sélectif (élimination des espèces adventices tout en préservant les espèces cultivées). Les produits synthétiques composant cette famille chimique induisent une croissance confuse et délétère du végétal cible qui finit par dépérir. Grâce à sa sélectivité, le 2,4-D connut dès sa sortie un réel succès qui perdure encore nos jours.

Les **urées substituées** sont des composés à action systémique. Suite au traitement des sols, elles sont assimilées par le végétal au niveau des racines. Grâce à un fort tropisme foliaire, elles atteignent les parties aériennes de la plante et permettent le blocage de la photosynthèse (Agence de l'eau Seine-Normandie, 2008). Par conséquent, le végétal ne peut plus produire les glucides nécessaires à sa survie et meure une fois ses réserves énergétiques épuisées.

Les **triazines** participent au jaunissement accéléré des feuilles. Ainsi, le rendement photosynthétique du végétal est fortement diminué (Agence de l'eau Seine-Normandie, 2008). Comme avec les urées substituées, le bilan énergétique de la plante est déficitaire et elle finit par mourir une fois ses réserves épuisées.

Les **ammoniums quaternaires** sont des composés non-sélectifs à action rapide. Par application foliaire, ils interfèrent dans le fonctionnement des chloroplastes. Dès lors, le carbone atmosphérique ne peut plus être assimilé, la photosynthèse n'a plus lieu et la plante finit par mourir (Casada, 2009). Les représentants de cette famille sont connus pour être très néfastes pour l'homme et les animaux en terme de toxicité aiguë et chronique. Le paraquat, le plus célèbre, a finalement été interdit dans toute l'Union Européenne en 2007.

Les propriétés herbicides du **glyphosate**, synthétisé pour la première fois en 1950, ont été décrites au début des années soixante-dix. Il s'agit d'un herbicide à large spectre. Son activité repose sur l'inhibition d'une enzyme, la 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthétase (EPSPS), impliquée dans la synthèse d'acides aminés nécessaires à la production de la chlorophylle. Cette toxicité entraîne ainsi une diminution de la photosynthèse et à terme, la mort

[◊] Auxinomimétique : molécule qui possède une activité similaire à l'auxine, l'hormone de croissance naturelle des végétaux.

de la plante. Bénéficiant d'une bonne implantation tant sur le marché professionnel que sur le marché domestique, le glyphosate est aujourd'hui l'herbicide le plus vendu au monde. Par ailleurs, le développement de cultures génétiquement modifiées résistantes au glyphosate a considérablement dynamisé le marché de cet herbicide (Rainaud, 2013).

Le pouvoir herbicide des **sulfonylurées** repose sur l'inhibition d'une enzyme : l'acétolactate synthase. Cette dernière est impliquée dans la synthèse de plusieurs acides aminés essentiels à la plante (Casada, 2009). En l'absence de ces constituants biochimiques, la croissance de la plante est interrompue.

2.2. Fongicides

L'activité des **carbamates** diverge d'une molécule à une autre : herbicide, fongicide ou insecticide. Parmi cette famille chimique, ce sont les thiocarbamates et les dithiocarbamates qui témoignent de propriétés antifongiques. Leur activité repose sur un blocage de la synthèse des acides nucléiques et de celle de l'ergostérol (Casada, 2009). L'ergostérol étant un constituant lipidique des membranes cellulaires fongiques, un déficit en cette molécule se traduit par perturbation de la formation des membranes cellulaires et la mort de l'organisme.

Les **benzimidazoles** perturbent la division cellulaire chez les champignons. En effet, ils bloquent la polymérisation de la tubuline lors de la mitose (Casada, 2009). Ainsi le développement des tissus et la croissance du champignon sont bloqués.

Les **triazoles** font partie des fongicides inhibiteurs de la biosynthèse des stérols (IBS). Les triazoles ciblent la C14 α -déméthylase, une enzyme participant à la formation de l'ergostérol (Casada, 2009). Ainsi, les triazoles provoquent une altération de la formation des membranes cellulaires et la mort du champignon. Ces composés constituaient avant 2005 le plus gros marché des fongicides.

Les **anilinopyrimidines** sont utilisées pour leur capacité à inhiber la biosynthèse de la méthionine chez le champignon cible. Or, cet acide aminé est essentiel pour la formation des hyphes mycéliennes. En son absence, le

champignon est par conséquent dans l'incapacité de développer les structures nécessaires à sa nutrition (Leroux et Gredt, 1995).

Les **strobilurines** ont été développées suite à l'étude du genre fongique *Strobilurus*. La faculté de ce champignon à développer un effet suppresseur sur les autres espèces fongiques avoisinantes a été remarquée et la molécule responsable de cette activité a été identifiée. Les strobilurines agissent au niveau de la respiration cellulaire des champignons. Par blocage de l'activité de l'un des complexes mitochondriaux, elles enravent la formation de l'adénosine triphosphate (ATP) et provoquent la mort du champignon. Cependant, de nombreux cas de résistance à cette famille ont été observés.

Les **carboxamides** forment la dernière génération de produits phytosanitaires mis sur le marché. Bien que les premiers carboxamides synthétisés datent des années soixante-dix, l'essor de cette famille, avec l'élaboration de molécules aux propriétés fongicides à faibles doses, n'est que très récent. Ce sont des inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (SDHI ou *succinate deshydrogenase inhibitors* en anglais). Cette enzyme intervient dans la chaîne respiratoire cellulaire des champignons (BASF Agro, « ADEXAR® »). Les carboxamides ont, en inhibant cette enzyme, une action comparable à celle des strobilurines.

2.3. Insecticides

Les **organochlorés**, issus du DDT, firent leur entrée sur le marché en 1945. Ils furent utilisés de manière intensive pendant une vingtaine d'années que ce soit en agriculture, en aménagement forestier ou pour le traitement du bois de construction : ils constituèrent une des classes majeures d'insecticides. Leur mode d'action consiste en une perturbation du fonctionnement des canaux ioniques neuraux. Peuvent être affectés les canaux sodiques voltage-dépendants ou les canaux chlore associés aux récepteurs de l'acide *gamma*-aminobutyrique (GABA ou *gamma-aminobutyric acid* en anglais), en fonction des propriétés de la molécule (Casada, 2009). Sont induites respectivement, une diminution de la transmission neuronale ou une hyperexcitabilité synaptique, qui se traduisent toutes les deux par la mort de l'insecte. Aujourd'hui, nombreux sont les composés appartenant à cette famille à être proscrits à travers le monde à cause de leur grande rémanence dans l'environnement et de leur toxicité.

Les composés **organophosphorés** ont été développés à la fin des années quarante. Ils forment la classe d'insecticide la plus importante d'entre toutes. Parmi ces substances actives, certaines sont dites à action systémique. Contrairement aux produits phytopharmaceutiques qui possèdent une action directe sur les nuisibles, les organophosphorés systémiques pénètrent dans les tissus de la plante et lui confèrent ainsi une résistance contre les parasites ciblés. Les organophosphorés, en inhibant l'acétylcholinestérase, induisent une accumulation de l'acétylcholine au niveau synaptique (Saïssy et Rüttimann, 1999). Ce mécanisme se traduit par le blocage de la transmission de l'influx nerveux et la mort de l'insecte. Ils présentent également l'avantage d'être bien moins persistants dans l'environnement que les organochlorés.

Les composés de la famille des **carbamates** possèdent des activités diverses d'un composé à l'autre : fongicides, herbicides ou insecticides. Les propriétés insecticides sont comparables au mode d'action des organophosphorés. En effet, ils inhibent également le processus cholinestérasique chez leurs cibles (Agence de l'eau Seine-Normandie, 2008). En comparaison, bien que faisant partie des classes majeures d'insecticides, ils sont moins utilisés que les organophosphorés.

Les **pyréthrinoïdes**, agents synthétiques, tiennent leur nom de la pyréthrine, molécule naturelle à laquelle ils se réfèrent chimiquement parlant. Ils présentent l'avantage d'être plus stables et plus puissants que leurs analogues naturels. Ces composés agissent en perturbant le fonctionnement des canaux sodiques voltage-dépendants (Casada, 2009). De cette manière, la transmission neuronale est compromise et la mort de l'insecte survient rapidement. Parmi les familles d'insecticides disponibles, celle-ci est réputée comme étant l'une des plus foudroyantes. L'activité insecticide de cette classe est telle qu'elle permet l'utilisation de doses à l'hectare bien inférieures : de l'ordre du dixième des doses requises avec les organophosphorés et les carbamates pour l'obtention d'une efficacité équivalente.

Les premières **benzoylurées** sont apparues au début des années soixante-dix. Elles agissent au stade larvaire des insectes comme régulateur de croissance. En effet, elles semblent bloquer l'activité de la chitine synthétase mais leur mécanisme d'action n'a pas été clairement établi (Casada, 2009). La formation de la chitine étant enrayée, les larves mourront lors de la mue suivante. Cette famille ne compte que peu de représentants et reste limitée dans son utilisation.

Les **néonicotinoïdes** forment une classe d'insecticides, agissant sur le système nerveux central des insectes, développée dès le début des années soixante-dix. Mais c'est dans les années quatre-vingt-dix, après une longue phase d'optimisation, que fut commercialisé le premier insecticide de cette famille. Ce sont des agonistes compétitifs des récepteurs cholinergiques de type nicotinique. Cette activité se traduit par une altération des mécanismes de mémorisation, d'olfaction chez l'ensemble des insectes et d'une diminution du réflexe d'extension du proboscis[◇] chez les insectes suceurs (Bodereau-Dubois, 2011). Ainsi, les néonicotinoïdes désorientent et perturbent l'alimentation de leurs cibles. Cette famille chimique, aux composés très persistants (Bonmatin *et al.*, 2003), s'est rapidement imposée et compte aujourd'hui parmi les insecticides les plus utilisés au monde.

Les pyréthriinoïdes et les néonicotinoïdes, pour leur rapidité d'action et les troubles d'orientation induits, respectivement, sont les deux familles chimiques les plus préoccupantes pour les pollinisateurs tels que les abeilles et les bourdons.

[◇] Proboscis : organe de succion rétractile chez les insectes.

Marché des pesticides

Après un aperçu des sources de données disponibles, l'usage des produits phytosanitaires en France sera développé, avant de s'intéresser aux données issues de l'Union Européenne et du marché mondial.

1. Données disponibles exploitées

Les données publiées en matière de pesticides ont des origines multiples et peuvent présenter des divergences. Les trois principales sources de données sont (Benoît *et al.*, 2005 ; UIPP, « Archives ») :

- l'Union des Industries de la Protection des Plantes ou UIPP fournit les chiffres de vente de 19 entreprises, représentant environ 96 % du marché français.
- l'*European Crop Protection Association* ou ECPA, adhérente de l'UIPP, regroupe les sept plus importantes firmes phytopharmaceutiques (Aventis Crop Science, Basf Agro, Bayer Cropscience, Dow Agrosciences, DuPont de Nemours, Monsanto, Syngenta), qui représentent à elles-seules 90 % du marché européen.
- la base de données FAOSTAT (fournie librement par la *Food and Agriculture Organization of United Nations* ou FAO) est constituée notamment par retour de questionnaires adressés aux pays membres.

Les données sont principalement obtenues à partir des ventes annuelles des firmes productrices de produits phytosanitaires. Il ne s'agit que d'estimateurs de l'utilisation réelle des produits phytosanitaires. Les données peuvent souffrir d'erreurs de précision de nature spatiale ou temporelle :

- erreurs trouvant leur cause dans les échanges commerciaux internationaux, surtout en zone frontalière. Ici, les produits phytosanitaires sont comptabilisés pour les ventes d'un pays alors qu'ils sont utilisés dans un autre.

- erreurs dues au stockage et déstockage de matières actives. Par exemple, un recul des ventes de pesticides peut traduire non pas une diminution de leur utilisation mais un phénomène de déstockage massif d'un stock constitué lors d'années précédentes.

De plus, la quantité des informations récoltées par la FAO (source publique au contraire des deux premières qui sont privées) n'est pas équivalente entre tous les pays (Benoît *et al.*, 2005).

Par ailleurs, il est envisageable de déterminer les quantités de produits phytosanitaires répandues par les professionnels. Un recensement complet étant impossible, on dénombre les quantités de pesticides appliquées sur une surface déterminée pour une culture donnée et on en déduit la quantité totale de pesticides utilisée pour cette même culture sur l'ensemble du territoire. Ces données obtenues par extrapolation ont l'avantage de ne pas être faussées par le stockage et les échanges internationaux comme les chiffres d'affaires des ventes annuelles. Néanmoins la surface d'étude doit être suffisamment étendue et représentative pour assurer la validité des conclusions.

2. En France

2.1. Données actuelles

Les ventes en produits phytosanitaires en France pour l'année 2010 de l'UIPP s'élèvent à environ 61900 tonnes de matières actives pour un montant estimé de 1799 millions d'euros (UIPP, « Archives »).

Ce bilan place la France au rang de premier consommateur de pesticides à l'échelle européenne et au quatrième rang au niveau mondial.

Cependant, ce constat doit être nuancé. La France, avec une surface agricole utile métropolitaine de près de 30 millions d'hectares, est également le premier producteur agricole européen. Il est donc logique que la France soit un gros consommateur de pesticides (Gatignol et Etienne, 2010). Par voie de

conséquence, il convient de considérer la consommation moyenne de pesticides par hectare cultivé.

La France se situe alors au troisième rang européen avec 5,4 kilogrammes de pesticides par hectare de terres arables et par an.

Remarque : la surface agricole utile (SAU) désigne la surface consacrée à la production agricole pour un territoire donné. Sont prises en compte :

- les terres arables : champs cultivés (12 millions d'ha[◇]) et jachères (1,3 million d'ha[◇]) ;
- les « surfaces toujours en herbe » : prairies permanentes et alpages (13 millions d'ha au total[◇]) ;
- les cultures pérennes : vignes, vergers, etc... (1,5 million d'ha[◇]).

A noter que les zones forestières (15,5 millions d'ha[◇]) en sont exclues. La surface totale de la France métropolitaine est de l'ordre de 54,5 millions d'hectares.

Ceci dit l'agriculture n'est pas le seul domaine où l'on a recours aux pesticides. On estime que les usages non-agricoles de ces produits (cadre privé, espaces verts, ...) représentent entre 6 % et 10 % de la consommation française (ORP, « Les données »).

Les ventes de 2009 en herbicides et en fongicides sont équivalentes et représentent environ 80 % du marché français (Illustration 2). Les insecticides représentent 6,6 % du marché et la part restante comprends les classes telles que les molluscicides, les rodenticides, etc... Toutefois, il s'agit là de proportions nationales qui ne peuvent être appliquées à une échelle moins étendue (régions, localités, exploitations, ...). En effet, on assiste à de grandes disparités quant aux quantités de pesticides utilisées entre les différentes régions de France, variabilité directement liée aux types de cultures rencontrées.

[◇] Chiffres français 2005 (Testud et Grillet, 2007).

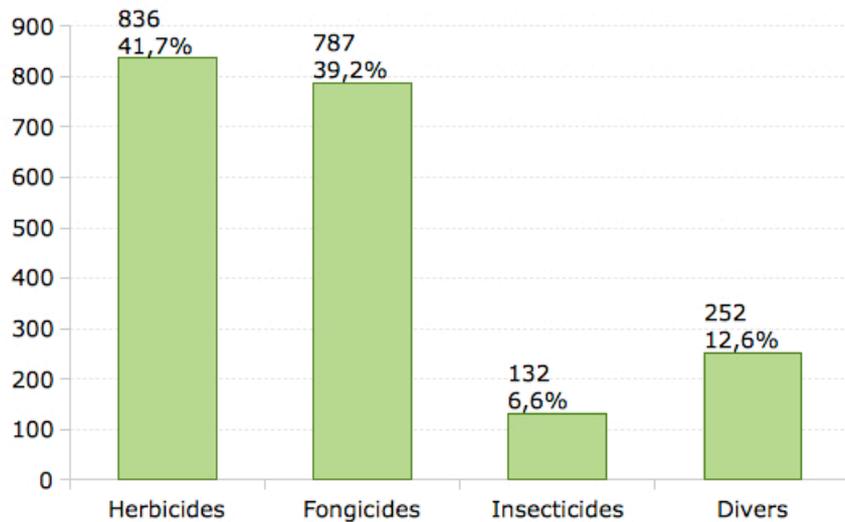


Illustration 2 : Répartition du marché français en 2009 par classe en millions d'euros
(Sources : UIPP, « Archives »)

En effet, au vu des chiffres 2006, seuls 5 % de la SAU nationale concentrent près de 25 % des consommations de produits sanitaires (Tableau 2). Près de 15 % des produits phytosanitaires sont destinés à la vigne qui n'occupe pourtant qu'environ 3 % de la SAU française. De même, l'horticulture et les cultures maraîchères représentent autour de 5 % des ventes alors que moins de 1 % de la SAU totale leur est alloué. Un constat similaire peut être dressé pour les vergers. Enfin la colonne « rapport €/ha » permet de rappeler les écarts de pressions phytosanitaires rencontrés entre les différentes régions de France.

Chaque type de culture présente des besoins, d'où de grandes disparités entre les différentes régions de France ; les produits utilisés fluctuent en fonction des bio-agresseurs propres à chaque culture. Ainsi, les céréales à paille et la vigne sont traitées principalement par des fongicides – 60 % et 80 % des traitements, respectivement – à la différence du maïs pour lequel les herbicides représentent 75 % des produits utilisés ou du colza qui nécessite de grandes quantités d'insecticides (Benoît *et al.*, 2005).

Tableau 2 : SAU et investissements phytosanitaires par types de production
(Sources : UIPP, « Archives »)

	SAU		Produits phytosanitaires		
	Hectares	% SAU	Millions d'€	%	rapport €/ha
Grandes cultures	11 609 000	45,7	1 556	67,4	134
Vigne	841 000	3,3	331	14,4	394
Fruits	202 000	0,8	119	5,2	590
Horticulture et maraîchage	205 000	0,8	108	4,7	527
Autres terres agricoles	12 563 000	49,4	190	8,3	15

SAU : surface agricole utile.

2.2. Données rétrospectives

Les archives de l'UIPP informent qu'en France, environ 95000 tonnes par an de produits phytosanitaires été utilisées dans les années 80 (Benoît *et al.*, 2005).

Les années 1990-2000 comprennent deux événements historiques pour le monde agricole (Illustration 3).

- 1992, premier événement : la politique agricole commune (PAC) prévoit désormais une mise obligatoire en jachère d'une part importante de la surface cultivable par les exploitants, impliquant une diminution de l'ordre de 20 % de l'utilisation totale de pesticides (majoritairement des herbicides) (Gatignol et Etienne, 2010).

Il s'ensuit une lente et régulière augmentation des ventes de pesticides expliquée par l'augmentation au sein de la SAU des terres arables au détriment des prairies, par une simplification progressive de la rotation des cultures et par la multiplication des surfaces non-labourées avant d'être exploitées. Ces pratiques intensifièrent considérablement le désherbage chimique et donc le recours aux pesticides (Benoît *et al.*, 2005).

- 2000, second événement : début de l'application d'une taxe à l'achat de produits phytopharmaceutiques qui permet d'expliquer le pic des ventes en 1999 (Benoît *et al.*, 2005).

Puis on note une lente diminution des ventes dans les années 2000-2010 (Illustration 3) expliquée par :

- L'utilisation limitée ou interdite de plusieurs substances actives d'usage majeur (retrait de l'atrazine à partir de 2001, limitation de l'utilisation du diuron en 2002, ...).
- La récession des ventes de fongicides minéraux (cuivre et soufre) à partir de 2001.
- L'adoption de méthodes « raisonnées » pour les traitements phytosanitaires (Gatignol et Etienne, 2010).

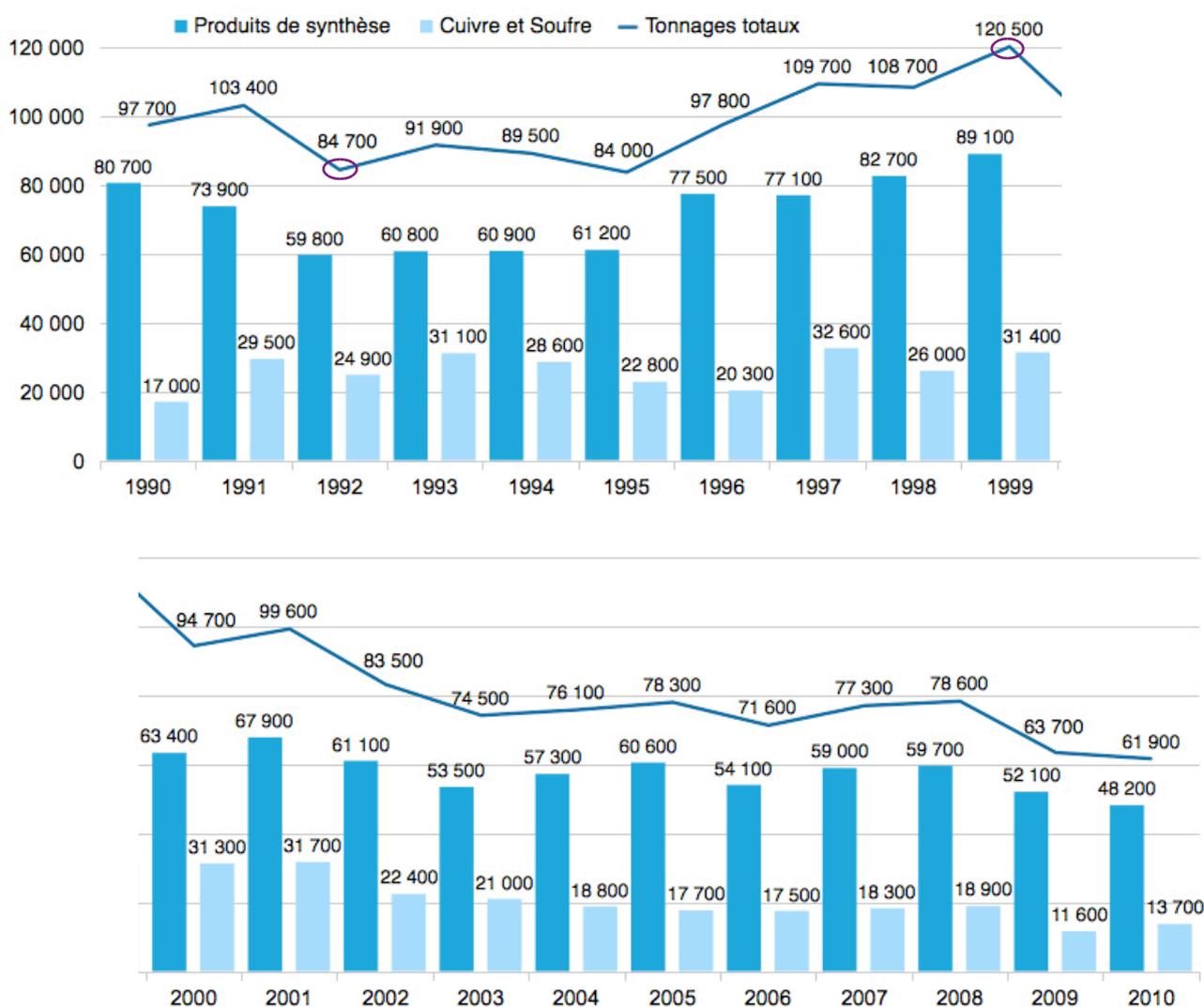


Illustration 3 : Quantités de substances actives vendues en tonnes, en France de 1990 à 2010

(Sources : Benoît *et al.*, 2005 ; ORP, « Les données » ; UIPP, « Archives »)

Actuellement, grâce aux efforts accomplis, on constate des tonnages inférieurs à ceux observés trente ans auparavant (UIPP, « Archives »). De plus les traitements renferment des substances actives à des doses de plus en plus faibles, d'où une accentuation de la diminution des tonnages utilisés. Mais ces traitements sont également de plus en plus chers, ce qui explique le maintien des chiffres d'affaires des ventes (Illustration 4).

À noter que malgré une diminution globale des quantités de pesticides utilisées, les quantités d'insecticides sont au contraire en augmentation (UIPP, « Archives »).

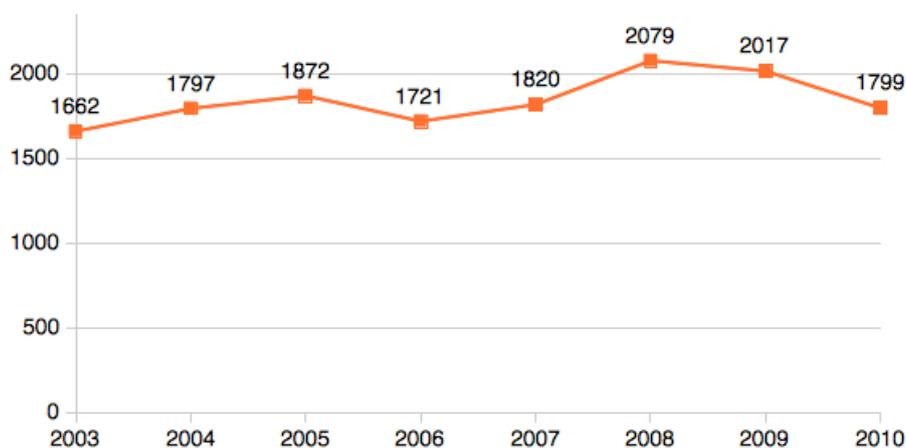


Illustration 4 : Chiffres d'affaires en millions d'euros en France de 2003 à 2010

(Source : UIPP, « Archives »)

3. Au sein de l'Union Européenne

Le marché européen des produits phytosanitaires atteint un chiffre d'affaires de 10584 millions de dollars (soit 7840 millions d'euros[◇] ; données ECPA 2010). Par ordre décroissant du volume total de pesticides vendus, on répertorie : la France, l'Allemagne, l'Italie, le Royaume-Uni et enfin l'Espagne. Ces cinq pays réalisent à eux-seuls la moitié des ventes européennes (UIPP, « Archives »).

Ces données confirment le rang de premier consommateur de pesticides de la France à l'échelle européenne.

[◇] Taux de conversion : 1 euro = 1,35 dollar au 01/03/12.

Le tableau 3 classe les pays membres en fonction du ratio de la consommation nationale par hectare rapportée à la consommation européenne par hectare. Ce calcul présente l'intérêt de tenir compte des SAU des états-membres. Il permet aussi d'attribuer la valeur « 1 » à la consommation moyenne européenne, les consommations relatives de chaque état se distribuant de part et d'autre de cette valeur.

Tableau 3 : Tonnages de principes actif et SAU relatifs des pays de l'UE

Etats-membres	Ventes en tonnes	Tonnage_{pays}/Tonnage_{UE} (A)	SAU_{pays}/SAU_{UE} (B)	Ratio (A)/(B)
Portugal	24 856	8,5%	2,9%	2,93
Pays-Bas	7 867	2,7%	1,4%	1,93
France	99 635	34,3%	21,0%	1,63
Belgique et Lux.	5 066	1,7%	1,1%	1,55
Italie	44 967	15,5%	11,0%	1,41
Allemagne	26 224	9,0%	12,1%	0,74
Espagne	40 894	14,1%	21,1%	0,67
Grèce	11 111	3,8%	6,0%	0,63
Royaume-Uni	20 176	6,9%	12,0%	0,58
(...)				
Union Européenne	290 866	100%	100%	1

SAU : surface agricole utile.

Les pays aux plus fortes consommations rapportées à l'hectare sont par ordre décroissant : le Portugal, les Pays-bas, la France, la Belgique et le Luxembourg et enfin l'Italie. La percée du Portugal, des Pays-Bas, de la Belgique et du Luxembourg s'explique par l'importance respectivement, de l'arboriculture, de l'horticulture et du maraîchage qui nécessitent de lourds traitements phytosanitaires (Benoît *et al.*, 2005 ; Gatignol et Etienne, 2010).

À noter que les chiffres cités sont issus des bases de données de l'ECPA et de la FAO pour l'année 2001 ; il faut donc entendre « Europe des quinze » sous l'appellation « Union Européenne ».

Selon ces critères, la France se situe au troisième rang européen (Benoît *et al.*, 2005).

Comme pour la France où l'on constate entre les régions des disparités dans les proportions de pesticides employées, il en est de même entre les Etats-membres. Ces dissemblances dans les usages peuvent être expliquées par les variations de climat. En effet, avec l'élévation des températures et de l'humidité, les insectes sont plus nombreux et les développements fongiques plus aisés. Ainsi les insecticides et les fongicides, fortement utilisés dans les pays méridionaux, le sont au contraire très peu dans les pays septentrionaux (Gatignol et Etienne, 2010).

4. Dans le monde

L'UIPP estime le marché mondial des pesticides (Illustration 5), relativement stable depuis ces dix dernières années, à plus de 38316 millions de dollars (soit plus de 28 milliards d'euros[◇] ; chiffres 2010) (ORP, « Les données » ; UIPP, « Archives »).

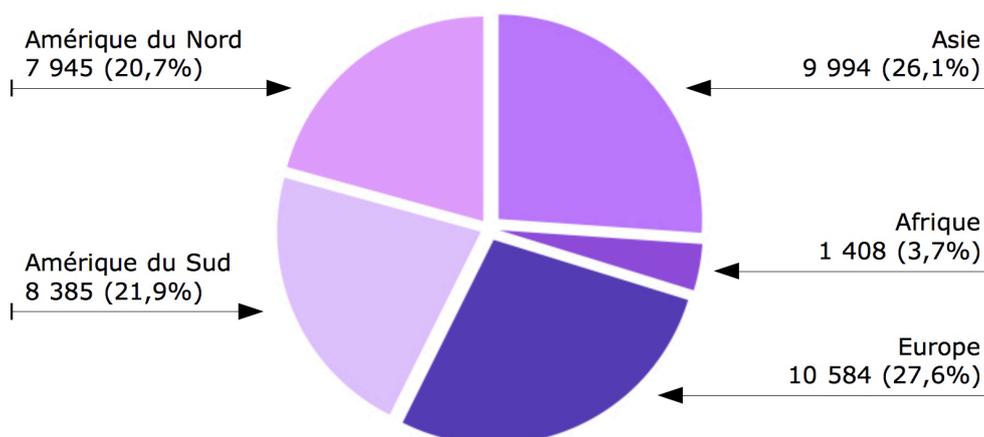


Illustration 5 : Chiffres d'affaires en 2010 en millions de dollars dans monde
(Source : UIPP, « Archives »)

[◇] Taux de conversion : 1 euro = 1,35 dollar au 01/03/12.

Et pour la répartition du marché non plus par région du globe mais par nation, les Etats-Unis se placent en tête avec des ventes atteignant 4,7 milliards d'euros. Ils sont suivis par le Brésil (3 milliards d'euros), le Japon (2,3 milliards d'euros) et la France (1,8 milliards d'euros) (UIPP, « Archives »).

La France se place au quatrième rang mondial en réalisant environ 6 % du chiffre d'affaires annuel du marché des pesticides.

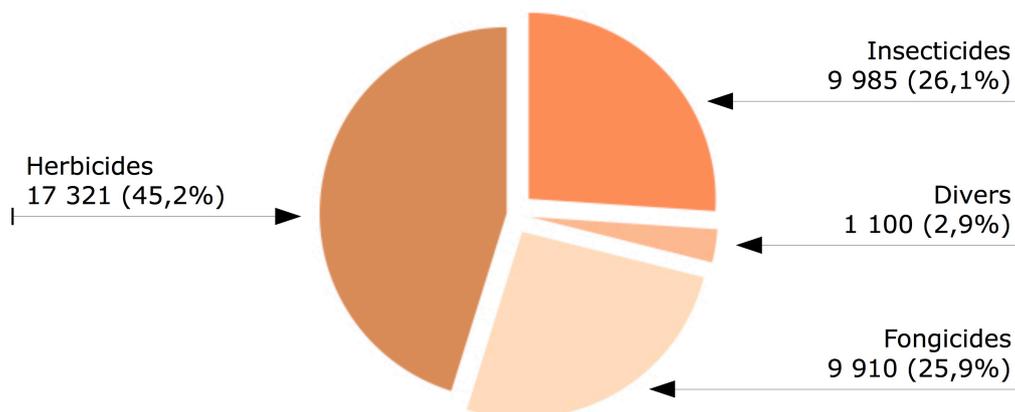


Illustration 6 : Chiffres d'affaires mondiaux par classe en 2010 en millions de dollars
(Source : UIPP, « Archives »)

Parmi les produits phytosanitaires (Illustration 6), les herbicides constituent la classe la plus vendue au monde avec un chiffre d'affaires d'un peu plus de 17 milliards de dollars (soit près de 13 milliards d'euros[◊]). Les fongicides et les insecticides affichent un chiffre d'affaires d'environ 10 milliards de dollars chacun (soit environ 7,4 milliards d'euros[◊]). Enfin, les produits phytopharmaceutiques n'entrant dans aucune de ces trois catégories représentent un peu plus de 1 milliard de dollars de chiffres d'affaires (soit un peu moins de 1 milliard d'euros[◊]) (UIPP, « Archives »).

[◊] Taux de conversion : 1 euro = 1,35 dollar au 01/03/12.

Synthèse

La lutte contre les ennemis des cultures satisfait un double objectif : assurer une production suffisante en conjugaison avec les fertilisants (objectif alimentaire) et repousser les vecteurs de maladies (objectif de santé publique).

De tout temps les cultivateurs ont eu recours à ces méthodes. Néanmoins les années trente marquent l'entrée dans l'ère des pesticides avec le développement de la chimie organique et l'élaboration de molécules synthétiques.

Des dénominations rencontrées, seul le « produit phytopharmaceutique » détient un statut législatif au sein du droit communautaire. Sous cette appellation sont désignées les substances actives ou les préparations de substances actives plus communément nommées « pesticides ».

Les produits phytosanitaires sont destinés à la protection des végétaux contre les organismes nuisibles. Ces substances sont classées en trois catégories principales en fonction de leur activité : herbicides, fongicides et insecticides utilisés, respectivement, pour leur action délétère sur les végétaux indésirables, contre les atteintes fongiques et en protection des insectes. Il peut également s'agir de principes actifs assurant la conservation des récoltes ou employés en traitements de prophylaxie sur les semences.

Parmi les produits phytopharmaceutiques, ce sont les pyréthriinoïdes et les néonicotinoïdes, deux familles d'insecticides, qui sont les plus incriminés dans la disparition des pollinisateurs.

Au regard de sa consommation en tonnages de substances actives, la France se situe au premier rang européen et au quatrième rang mondial. En relativisant ces données par rapport à la surface nationale des terres arables, la France occupe la troisième place au sein de l'Union Européenne.

En outre, de grandes disparités sont constatées entre les différentes régions françaises et, dans un champ de vision plus étendu, entre les différents pays du globe. Le profil de la consommation en produits phytosanitaires est dépendant des régions considérées, des climats rencontrés et des cultures implantées.

SECONDE PARTIE

EXTRACTION ET DOSAGE DE RÉSIDUS DE PRODUITS PHYTOSANITAIRES DANS LE POLLEN

État de l'art

1. Présentation

Au regard de la littérature, les études traitant de l'analyse de résidus de produits phytopharmaceutiques dans la matrice pollen sont assez nombreuses. Certains auteurs se concentrent sur l'étude d'un composé – notamment, l'imidaclopride (Byrne *et al.*, 2013 ; Kasiotis *et al.*, 2011) ou le fipronil (Jiménez *et al.*, 2007 ; Kadar et Faucon, 2006) – tandis que d'autres auteurs préfèrent considérer une famille chimique entière – par exemple, les néonicotinoïdes (Dively et Kamel, 2012) ou les organochlorés (Vazquez-Quintal *et al.*, 2012) – au travers de leurs travaux.

Mais peu nombreuses sont les études traitant de dosages multi-résidus dans la matrice pollen. Au regard de la littérature, les seules références bibliographiques sont les études menées par Bernal *et al.* (2010), Berrada *et al.* (2010), Chauzat *et al.* (2006)(2011), Mullin *et al.* (2010) et Wiest *et al.* (2011).

Ce constat peut s'expliquer par le fait que le pollen soit une matrice d'étude d'utilisation relativement récente pour le dosage de résidus de produits phytosanitaires. Effectivement, bien que les premiers travaux en matière de recherche de résidus de pesticides au sein des pollens soient déjà anciens (Ross et Harvey, 1981), le choix de cette matrice est longtemps resté secondaire jusqu'à ces dernières années (Villa *et al.*, 2000).

Pour la réalisation d'un dosage multi-résidus, la première étape est de définir un protocole de prélèvement du pollen. Ensuite, les questions de transport et de conservation des échantillons sont à étudier.

Au laboratoire, est réalisé le traitement de l'échantillon. Il a pour objectif d'isoler les analytes d'intérêt par extraction depuis la matrice. En addition à cette étape d'extraction, le traitement de l'échantillon comprend également une étape de purification.

En effet, le pollen est reconnu comme étant une matrice d'étude complexe. Lors de l'étape d'extraction, de nombreux composés matriciels peuvent être extraits conjointement aux analytes. Ces composés peuvent ensuite être sources d'interférences lors le dosage des résidus de produits phytopharmaceutiques. Il est donc nécessaire de purifier l'extrait avant l'étape de dosage afin d'éliminer de l'extrait ces composés issus de la matrice.

Par ailleurs, les concentrations à doser pouvant être faibles (résidus parfois à l'état de traces dans les échantillons), une étape de concentration de l'éluat peut aussi être prévue (Barakat *et al.*, 2007 ; Kadar et Faucon, 2006 ; Wiest *et al.*, 2011).

Enfin, l'analyse proprement dite des résidus de produits phytosanitaires est réalisée. Le dosage est généralement assuré par une technique chromatographique.

Ainsi, l'objectif de la préparation de l'échantillon est d'obtenir un extrait riche en analytes mais pauvre en composés matriciels. C'est cette étape de préparation de l'échantillon qui a été investiguée et développée dans ce travail de thèse. La partie relative au dosage chromatographique s'est appuyée sur les méthodes de dosage déjà validées au sein du laboratoire.

Une revue de la littérature portant sur les méthodes de prélèvement et de préparation des échantillons de pollen en vue d'un dosage de résidus de produits phytosanitaires a été réalisée. Elle a permis de recenser les différentes méthodes existantes et de mettre en avant leurs spécificités expérimentales.

2. Echantillonnage

Plusieurs modes de prélèvement de pollen sont envisageables. On peut en citer quatre récurrents dans les études scientifiques : i) prélèvement dans l'air ambiant ; ii) prélèvement directement sur les fleurs ; iii) prélèvement sur les abeilles butineuses ; iv) prélèvement au sein de la ruche. De plus, il est important de souligner qu'en fonction du point de prélèvement, les perspectives de l'étude peuvent diverger (Dively et Kamel, 2012).

À noter que, quelle que soit la technique de prélèvement appliquée, Bernal *et al.* (2010) préconisent de récolter et de manipuler aseptiquement les échantillons de pollen (port de gants stériles, outils de récolte propres, ...) afin d'écartier tout risque de contamination des échantillons.

2.1. Prélèvement dans l'air ambiant

Les prélèvements de pollen sont réalisés à l'aide de pompes à air qui par aspiration piègent les grains de pollen libres dans l'atmosphère sur une mousse en polyuréthane.

En fonction du point de prélèvement, à proximité ou éloigné des zones traitées par des produits phytopharmaceutiques, il est possible d'évaluer un niveau de pollution ambiante maximale ou de fond, respectivement.

2.2. Prélèvement sur les fleurs

De nombreux auteurs optent pour un prélèvement manuel du pollen sur les fleurs (Bonmatin *et al.*, 2003 ; Chauzat *et al.*, 2006 ; Dively et Kamel, 2012).

Cette méthode a pour avantage de rendre compte des concentrations en produits pesticides retrouvés sur les cultures.

2.3. Prélèvement sur les butineuses

Le pollen peut être récolté à l'aide de trappes à pollen installées à l'entrée de la ruche (Byrne *et al.*, 2013 ; Smodiš Škerl *et al.*, 2009 ; Vazquez-Quintal *et al.*, 2012). Ces trappes sont équipées d'un peigne (Illustration 7) dont le calibre permet le libre passage des abeilles mais décroche le pollen porté par les butineuses lors de leur retour à la ruche. Le pollen tombe par gravité dans un panier.



Illustration 7 : Trappe à pollen d'entrée, avec peigne et panier
(Source : www.apiculture.net)

Il peut être également envisagé de capturer des abeilles de retour de butinage et d'extraire à l'aide d'un brossage minutieux les grains de pollen fixés sur les pattes et l'abdomen de l'animal. Cependant, au regard de la littérature, cette technique d'échantillonnage demeure anecdotique car elle n'a été appliquée que dans une seule étude (Choudhary et Sharma, 2007).

Ces deux techniques permettent de renseigner sur les quantités de produits phytosanitaires amenées à la ruche.

2.4. Prélèvement dans la ruche

Bien que plus souvent mis en œuvre pour la récolte des autres matrices de la ruche telles que le miel ou la cire d'abeille, un prélèvement de pollen à l'intérieur de la ruche est possible. Le pollen peut être extrait des cadres sur lesquels vit l'essaim (Mullin *et al.*, 2010). À ce niveau, le pollen est lentement transformé en pain d'abeille – substrat composé de pollen, de nectar et de sécrétions salivaires agrégeantes mis à fermenter – qui représente une source alimentaire majeure pour la colonie (Vazquez-Quintal *et al.*, 2012).

Par ailleurs des trappes de plancher de ruche pour la récolte du pollen chutant des cadres peuvent être installées mais, au vu de la littérature, aucune étude scientifique ne les mentionne.

L'intérêt repose ici sur la détermination des concentrations d'exposition par voie digestive de la colonie aux produits phytosanitaires.

3. Transport et conservation

Peu d'informations concernant les modalités d'acheminement des échantillons de pollen sont disponibles dans la littérature scientifique. Seules deux études abordent le sujet en évoquant un transport par camion réfrigéré à -18°C (Chauzat *et al.*, 2011 ; Kadar et Faucon, 2006).

Une fois acheminés au laboratoire, une conservation à l'abri de la lumière des échantillons de pollen avant analyse est conseillée par plusieurs auteurs (Bernal *et al.*, 2010 ; Bonmatin *et al.*, 2003 ; Jiménez *et al.*, 2007). Cette précaution a pour but d'éviter la dégradation des produits phytosanitaires sensibles à la lumière.

Par ailleurs, les échantillons de pollen résistent mal aux contaminations fongiques et bactériennes. Ce phénomène peut s'expliquer par les taux élevés d'humidité mesurés dans le pollen. Par conséquent, Campos *et al.* (2008) conseillent de conserver les échantillons au congélateur avant analyse. Plusieurs températures de conservation des pollens sont rencontrées dans la littérature : de -80°C (Dively et Kamel, 2012) à -4°C (Choudhary et Sharma, 2007) ; ceci dit, la température de conservation la plus communément citée est -20°C (Bernal *et al.*, 2010 ; García-Chao *et al.*, 2010 ; Mullin *et al.*, 2010 ; Smodiš Škerl *et al.*, 2009).

4. Modalités de la préparation de l'échantillon

4.1. Extraction

Dans un dosage multi-résidus de produits phytosanitaires, des analytes aux structures moléculaires diverses sont analysés simultanément. Le protocole élaboré pour l'extraction des analytes se doit d'être le plus universel possible afin de couvrir l'intégralité du spectre des composés recherchés.

L'extraction des analytes peut être débutée immédiatement après le dégel complet – et à l'abri de la lumière de préférence – des échantillons de pollen. Jiménez *et al.* (2007) ont cependant appliqué une étape de séchage à

25°C pendant 3 jours des échantillons de pollen avant de les traiter dans le but d'augmenter l'efficacité de l'extraction. Ainsi, grâce à une meilleure pénétration du solvant d'extraction dans une matrice préalablement séchée, l'extraction des analytes serait facilitée.

Dans le même but, d'autres équipes ont préalablement pulvérisé les sacs polliniques avant de débuter le traitement des échantillons (Bernal *et al.*, 2010 ; Choudhary et Sharma, 2007 ; Kadar et Faucon, 2006 ; Vazquez-Quintal *et al.*, 2012). L'efficacité de l'extraction, en raison d'une plus grande surface de contact entre la matrice et le solvant, est ici aussi potentiellement améliorée.

Enfin, la prise d'essai – c'est-à-dire la masse de pollen à utiliser pour la préparation de chaque échantillon – doit être définie avec soin. Les résidus de produits phytosanitaires pouvant être présents qu'à l'état de traces dans les pollens, la quantité de ces derniers à analyser doit donc être suffisante afin qu'ils puissent être détectés. Au regard de la littérature, les dosages sont réalisés sur des masses de pollen situées entre 500 mg (Byrne *et al.*, 2013) et 10 g (Bonmatin *et al.*, 2003 ; Smodiš Škerl *et al.*, 2009).

4.2. Purification

La complexité de la matrice pollen tient à un taux d'humidité élevé (20 à 30%) (Campos *et al.*, 2008) et à une riche teneur en sucres (30 % environ) (Blanc, 2010) et en composés lipidiques (2,5 % en moyenne) (Somerville, 2006) tels que des acides gras et des mono-, di- et triglycérides. De plus, l'analyse de résidus de produits phytosanitaires est également ardue à cause des pigments et des peptides retrouvés dans le pollen.

Tous ces composants trouvés dans le pollen peuvent induire un effet matriciel, problème majeur rencontré lors de l'analyse du pollen. Deux phénomènes permettent de l'expliquer.

D'une part les analytes sont « protégés » par la matrice. En effet les constituants du pollen peuvent être comparés à une barrière limitant la libération des analytes dans le solvant d'extraction. Par conséquent,

l'extraction des composés possédant la plus grande affinité pour la matrice peut être délicate. Au niveau analytique, cet inconvénient se traduit par l'établissement de rendements d'extraction fortement diminués pour les composés concernés.

D'autre part, des composés organiques matriciels peuvent être extraits conjointement aux analytes et se retrouver ainsi dans le solvant d'extraction. Ces composés issus du pollen sont une source importante d'interférences au moment du dosage par spectrométrie en constituant un « bruit de fond » plus ou moins perceptible. D'un point de vue analytique, cet inconvénient se traduit par l'obtention de spectrogrammes laissant apparaître de nombreux pics parasites. Ceux-ci peuvent masquer les pics associés aux analytes, et par conséquent compromettre le dosage (Fujita *et al.*, 2008 ; Morzycka, 2002).

Des deux phénomènes précédemment décrits, le « bruit de fond » est le seul à pouvoir être sensiblement diminué par la mise en œuvre d'une étape de purification de l'extrait avant injection. À noter que cette purification peut être réalisée après l'étape d'extraction ou conjointement. Au contraire le premier phénomène, lié à la nature même de la matrice d'étude, peut difficilement être évité.

4.3. Diversité des protocoles

Au regard de la littérature, plusieurs protocoles d'extraction et de purification sont applicables à la matrice pollen dans le cadre d'un dosage multi-résidus. Il est possible d'en recenser quatre différents qui sont détaillés au cours des sections suivantes :

- extraction mécanique par solvant et purification successives (cf. Section 5),
- extraction et purification successives par méthode QuEChERS (cf. Section 6),
- extraction et purification simultanées par MSPD (cf. Section 7),
- extraction et purification simultanées par PLE (cf. Section 8).

5. Extraction mécanique par solvant et purification successives

5.1. Extraction

Les analytes peuvent être extraits directement depuis la matrice vers un solvant organique par action mécanique. Un dosage multi-résidus implique l'intégration, dans un seul et même protocole, de composés aux propriétés très diverses voire opposées en terme de polarité. Pour couvrir l'ensemble du spectre des solutés d'intérêt, le solvant doit être ni trop polaire ni trop apolaire afin d'assurer une extraction de tous les types d'analytes (Anastassiades *et al.*, 2003). De ce fait, les solvants utilisés pour la phase organique doivent présenter une polarité intermédiaire.

L'acétonitrile est, de loin, le solvant le plus fréquemment utilisé dans les études scientifiques (Bernal *et al.*, 2010 ; Byrne *et al.*, 2013 ; Kadar et Faucon, 2006). Mais d'autres auteurs lui préfèrent l'acétate d'éthyle (Sánchez-Brunete *et al.*, 2008) ou l'acétone (Chauzat *et al.*, 2006), ou encore un mélange de solvants comme acétone et dichlorométhane (Smodiš Škerl *et al.*, 2009) ou méthanol et dichlorométhane (Chauzat *et al.*, 2011).

Une étude a montré que les extraits obtenus par action de l'acétate d'éthyle étaient plus riches en composés lipidiques matriciels que lors d'une extraction avec l'acétonitrile (Sánchez-Brunete *et al.*, 2008). Ce constat peut s'expliquer au regard des polarités de ces deux solvants : l'acétate d'éthyle est en effet légèrement plus apolaire que l'acétonitrile.

Par ailleurs, lors d'études plus spécifiques de la famille des néonicotinoïdes, des mélanges incluant de l'eau ont été privilégiés au vu du caractère polaire que présentent les composés de cette famille chimique. Ainsi les auteurs ont opté pour des mélanges à base de méthanol et d'eau (García-Chao *et al.*, 2010 ; Schoning et Schmuck, 2003), d'éthanol et d'eau (Bonmatin *et al.*, 2003), ou d'acétonitrile et d'eau (Kamel, 2010).

Pour en extraire les résidus de produits phytosanitaires, le pollen est immergé dans le solvant d'extraction et l'ensemble est soumis à une agitation qui a pour fonction de faciliter le transfert des analytes depuis la matrice vers le solvant. La méthode d'agitation varie entre les études disponibles dans la

littérature. En effet, elle est réalisée dans un bain à ultrasons (Kadar et Faucon, 2006 ; Rossi *et al.*, 2005) ou à l'aide d'une unité rotative (Bernal *et al.*, 2010 ; Bonmatin *et al.*, 2003). Par ailleurs, Choudhary et Sharma (2007) ont moulu avec mortier et pilon le pollen directement dans le solvant d'extraction.

Ensuite, après une étape de filtration ou de centrifugation, un extrait propre peut être obtenu.

Cependant, ces techniques peuvent nécessiter de grands volumes de solvant. Les quantités de résidus de produits phytopharmaceutiques pouvant être faibles dans le pollen, l'usage de grands volumes de solvant peut amener à l'obtention d'un extrait trop faiblement concentré en solutés pour être analysé. Ceci impose la réalisation d'étapes subsidiaires de concentration de l'extrait, par évaporation notamment, avant injection dans le système chromatographique (Rossi *et al.*, 2005).

Une fois l'extraction terminée, les auteurs ont appliqué des techniques de purification très diverses. Elles sont détaillées ci-après, et présentées dans le même ordre que dans les protocoles lorsque plusieurs d'entre elles étaient successivement appliquées.

5.2. Purification par extraction liquide-liquide

Pour rappel, l'extraction liquide-liquide (LLE ou *liquid-liquid extraction* en anglais) consiste en un partage des analytes entre deux liquides. La séparation repose sur le transfert des composés par contact entre les deux phases. Ces deux phases doivent impérativement être non-miscibles et de masses volumiques différentes. Bien que cette méthode requière de nombreuses manipulations, elle présente l'avantage d'être bon marché et de nécessiter que peu de matériel pour être mise en œuvre (Colas, 2006).

Il s'agit, comme le rappelle Bou Khouzam (2011), de la technique la plus anciennement utilisée dans l'analyse de résidus de pesticides dans des matrices liquides. Elle n'est cependant pas applicable en tant que technique d'extraction sur une matrice solide comme le pollen. Néanmoins, elle est fréquemment utilisée à la suite d'une extraction en tant que technique de purification.

Ici, l'extrait est transféré dans un matériel de mélange en présence d'un solvant organique de lavage. Divers appareils tels que des ampoules à décanter, des colonnes ou des mélangeurs – au choix – sont utilisés dans le but de mélanger les phases. L'agitation du milieu se traduit par une augmentation de la surface de contact entre les phases, et concourt ainsi à favoriser les transferts d'analytes. Après mélange, la séparation des deux phases peut s'obtenir par décantation ou par centrifugation (Colas, 2006).

Ce lavage de l'extrait est un moyen facile d'en éliminer les composés matriciels les plus hydrophobes à l'aide d'un solvant très apolaire, qui sera ensuite rejeté (Przybylski et Segard, 2009 ; Wiest *et al.*, 2011). Ainsi, l'extrait peut être purifié des corps lipidiques extraits de la matrice. Les solvants utilisés à cette finalité sont, selon les études, l'hexane (Bonmatin *et al.*, 2003 ; Chauzat *et al.*, 2006 ; Kadar et Faucon, 2006) ou le cyclohexane (Schoning et Schmuck, 2003 ; Smodiš Škerl *et al.*, 2009).

Néanmoins, avec cette technique de lavage, une perte des analytes les plus apolaires est envisageable. Les volumes de l'extrait et du solvant apolaire doivent être déterminés de sorte que le maximum de composés matriciels soit éliminé tout en minimisant les pertes en analytes (Kadar et Faucon, 2006 ; Morzycka, 2002 ; Wiest *et al.*, 2011).

5.3. Dessiccation du milieu

Comme déjà évoqué, le pollen est une matrice présentant un fort taux d'humidité. De plus, l'acétonitrile, très utilisé comme solvant d'extraction, est miscible à l'eau. Dans l'objectif de séparer du milieu cette eau résiduelle, les auteurs ont souvent recours à des sels dessiccateurs (Wilkowska et Biziuk, 2011). Il peut s'agir de sulfate de magnésium ($MgSO_4$) (Kamel, 2010) , de sulfate de sodium ($NaSO_4$) (Choudhary et Sharma, 2007), ou de chlorure de

sodium (NaCl), ou encore d'un mélange de ces sels (Wiest *et al.*, 2011). Mais il ne s'agit pas de la seule méthode employée. En effet, d'autres études révèlent l'usage de terre de diatomée afin d'éliminer les traces d'eau (Schoning et Schmuck, 2003). L'extrait est ensuite décanté par centrifugation ou filtré.

5.4. Purification par extraction en phase solide

L'extraction en phase solide (SPE ou *solid-phase extraction* en anglais) est une technique performante et rapide pour l'extraction d'analytes à partir d'une matrice liquide. Dans le cadre de la préparation des échantillons de pollen en vue d'un dosage des résidus de produits phytosanitaires, cette technique est appliquée pour un objectif différent.

En effet, elle est effectuée afin de purifier l'extrait des composés matriciels qu'il pourrait contenir (Illustration 8). L'extrait obtenu en sortie d'une colonne-seringue SPE, préalablement remplie d'une phase adsorbante, contient les analytes d'intérêt tandis que les composés issus de la matrice extraits conjointement aux analytes lors de la phase d'extraction restent adsorbés sur la phase solide.

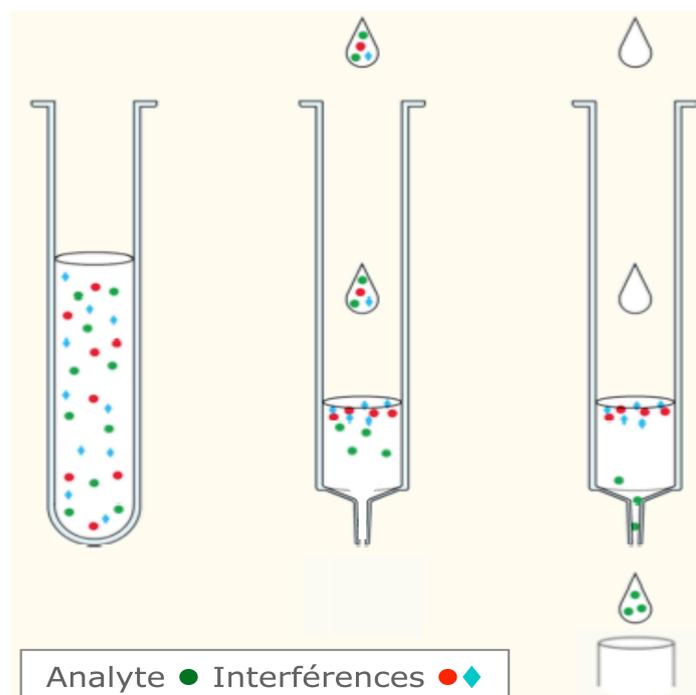


Illustration 8 : Principe d'une méthode SPE
(Source : Colas, 2006)

Plusieurs phases solides pour SPE sont disponibles, en vrac ou en cartouches pré-remplies par les fournisseurs. La purification par SPE doit être en accord avec les propriétés des analytes que l'on veut conserver dans l'extrait et des composés matriciels que l'on cherche à éliminer (Lesellier, « Cours »).

Les **phases apolaires** utilisées par les auteurs pour la préparation d'échantillons en vue d'un dosage de résidus de produits phytosanitaires dans le pollen sont de deux types.

D'une part, sont très souvent citées dans la littérature les phases de type C18 (ODS ou *octa decyl silica* en anglais) (Bernal *et al.*, 2010 ; Kamel, 2010). Il s'agit d'une base de silice sur laquelle ont été greffées des chaînes longues carbonées (MN, « Products for SPE »). Les travaux menés par Jiménez *et al.* (2007) ont montré la capacité de ce type de phase stationnaire à séparer de l'extrait les corps gras issus de la matrice.

D'autre part, une phase à équilibre hydrophile-lipophile (HLB ou *hydrophilic-lipophilic balance* en anglais) est également utilisée (Chauzat *et al.*, 2011 ; Fujita *et al.*, 2008). Cette phase stationnaire est constituée de particules d'un polymère de styrène et de vinyle. Elle présente les mêmes propriétés que la phase C18.

Les **phases polaires** sont également utilisées. Différentes phases stationnaires de ce type sont rencontrées dans le cadre de la purification d'un extrait en vue d'un dosage de résidus de produits phytopharmaceutiques. Il peut s'agir, selon l'étude considérée, d'un gel de silice (groupement actif : SiOH) (Chauzat *et al.*, 2006 ; Schoning et Schmuck, 2003), de Florisil® (García-Chao *et al.*, 2010 ; Jiménez *et al.*, 2007 ; Kadar et Faucon, 2006 ; Rossi *et al.*, 2005) ou d'alumine (aussi appelée oxyde d'aluminium) (Fujita *et al.*, 2008). Toutes ces phases présentent l'intérêt de piéger très efficacement les composés matriciels polaires tels que les pigments dont le pollen est riche (MN, « Products for SPE » ; Restek, « Préparation des échantillons »).

En effet, Fujita *et al.* (2008) ont démontré la capacité d'une phase solide stationnaire à base d'alumine à fixer les composés matriciels tels que les

pigments. Lors de cette étude, les auteurs ont constaté que les extraits en sortie de SPE en présence d'alumine étaient sensiblement plus clairs – donc moins pigmentés – qu'en entrée de SPE.

De plus, l'affinité du Florisil® – adsorbant sélectif composé à 85 % de silice et à 15 % d'oxyde de magnésium (Materialharvest, « Florisil® ») – pour les pigments floraux a été étudiée et mise en avant (Jiménez *et al.*, 2007).

Les **supports échangeurs d'ions**, qui peuvent être des échangeurs de cations ou d'anions, constituent un autre type de phase solide.

Dans le cadre de dosages de résidus de produits phytosanitaires dans la matrice pollen, un système échangeur d'anions est souvent employé (Byrne *et al.*, 2013). Il s'agit d'une silice sur laquelle ont été greffés des groupements amines primaires et secondaires (PSA ou *primary and secondary amine exchange material* en anglais) (MN, « Products for SPE »). Ce système, compte tenu de sa capacité à retenir les sucres et les acides gras matriciels (Pareja *et al.*, 2011), est très intéressant dans le cadre d'une analyse des pollens.

Par ailleurs, la rétention des composés acides par un système PSA n'est efficace que lorsque ceux-ci sont dans l'état neutre. Un milieu acide permettant de maintenir les acides faibles – tels que les acides gras – dans cet état, l'ajout d'un tampon acide est recommandé lorsqu'une colonne incluant un système PSA est mise en œuvre (Koesukwiwat *et al.*, 2010 ; Lehotay *et al.*, 2005).

Il existe également des **supports spécifiques** auxquels certaines études font référence. Il s'agit de supports n'entrant pas dans les catégories sus-citées et qui sont utilisés dans le but de purifier l'extrait de composés interférents particuliers.

Parmi ces supports, le carbone graphite (GCB ou *graphitized carbon* en anglais) est cité dans la littérature (Vazquez-Quintal *et al.*, 2012 ; Wiest *et al.*, 2011). Les molécules à chaînes longues carbonées, comme les pigments et les acides gras, sont facilement adsorbées à la surface des particules de ce support (MN, « Products for SPE »). Par conséquent, il présente un grand intérêt dans le cadre d'un dosage de résidus de produits phytosanitaires dans le pollen.

Enfin, il existe des **échangeurs mixtes**. Ceux-ci, composés par le mélange de deux phases de types différents, possèdent les caractéristiques de chaque phase du mélange.

Ainsi, les auteurs d'une étude ont expérimenté un mélange composé d'une phase apolaire C18 et d'un support échangeur d'anions de type PSA (Wiest *et al.*, 2011). Cet échangeur mixte permet d'isoler de l'extrait les composés cibles lorsque le caractère apolaire seul ou ionique seul ne suffit pas. Par conséquent, la rétention des composés interférents tels que les acides gras serait améliorée.

Au travers d'une autre étude, un échangeur mixte composé de deux tiers de système PSA et d'un tiers de GCB a été proposé (Mullin *et al.*, 2010). Cet échangeur mixte permet d'isoler de l'extrait les composés cibles lorsque le caractère ionique seul ou la structure moléculaire seule ne suffit pas. Ainsi, de même qu'avec le précédent échangeur mixte, la rétention des acides gras serait améliorée.

L'extrait obtenu suite à une purification par SPE peut être alors analysé, tant par chromatographie liquide (CL) que par chromatographie en phase gazeuse (CPG). De plus, cette technique de purification présente l'avantage de ne requérir que de faibles quantités de solvant pour sa mise en œuvre (Colas, 2006).

5.5. Purification par chromatographie par filtration sur gel

La chromatographie par filtration sur gel (GPC ou *gel permeation chromatography* en anglais) est également appelée chromatographie d'exclusion stérique (SEC ou *size exclusion chromatography* en anglais). Cette technique permet la séparation des molécules présentes dans le milieu en fonction de leur taille. Pour assurer cette séparation, la colonne préparatrice est remplie d'un matériau microporeux. Ici, l'élimination des éléments issus de la matrice ne repose pas sur leur affinité chimique avec la phase stationnaire mais sur leur inclusion physique dans les particules de la phase.

Cette technique est utilisée dans le cadre d'une analyse de résidus dans le pollen afin d'ôter les composés de haut poids moléculaire tels que les lipides, les protéines et les pigments. Ces composés traversent rapidement la colonne tandis que les analytes de plus bas poids moléculaire sont freinés par la phase stationnaire. Ces derniers sont ensuite élués par un solvant. Cette technique peut être appliquée en amont d'une analyse par chromatographie liquide ou d'une analyse par chromatographie en phase gazeuse.

Cependant les grands volumes de solvant, que cette purification nécessite, ainsi que la désorption de composés de bas poids moléculaire, depuis la phase stationnaire vers la phase mobile, limite son utilisation. Au regard de la littérature, elle n'a été appliquée que lors d'une seule étude (Smodiš Škerl *et al.*, 2009).

5.6. Cryopurification

Enfin, en étape subsidiaire, le soluté d'extraction peut être congelé puis centrifugé ou filtré. Ainsi, les composés matriciels, de haut poids moléculaire, peuvent être éliminés. Cette technique, décrite par Ross et Harvey (1981), n'a été que rarement appliquée dans le cadre d'un dosage de résidus de produits phytosanitaires dans le pollen. En effet, seules deux études en font mention (Sánchez-Brunete *et al.*, 2008 ; Vazquez-Quintal *et al.*, 2012).

6. Extraction et purification successives par méthode QuEChERS

La méthode d'extraction QuEChERS, acronyme anglais de « *quick, easy, cheap, effective, rugged & safe* », a été développée par Anastassiades *et al.* (2003). Cette méthode permet l'extraction facile et rapide d'un large spectre d'analytes tout en ne requérant que de faibles volumes de solvant et peu de matériel. Son adaptabilité à de nombreuses matrices et son coût réduit expliquent le succès qu'elle connut rapidement après sa mise au point. D'ailleurs, la méthode QuEChERS est aujourd'hui admise comme méthode de référence pour le dosage multi-résidus de produits phytopharmaceutiques dans les aliments (Koesukwiwat *et al.*, 2010 ; Wilkowska et Biziuk, 2011).

Tout d'abord, l'extraction des analytes est assurée par agitation manuelle ou sur vortex dans un faible volume d'acétonitrile, de l'ordre de la dizaine de millilitres (Illustration 9). Ainsi, aucune étape de concentration de l'extrait n'est nécessaire. Ensuite, une dessiccation du milieu par l'ajout d'un mélange salin de $MgSO_4$ et $NaCl$ est effectuée. Enfin, avant que l'éluat ne soit analysé par chromatographie liquide ou par chromatographie en phase gazeuse, une étape de purification par méthode SPE, telle que les méthodes de ce type décrites précédemment, est réalisée.

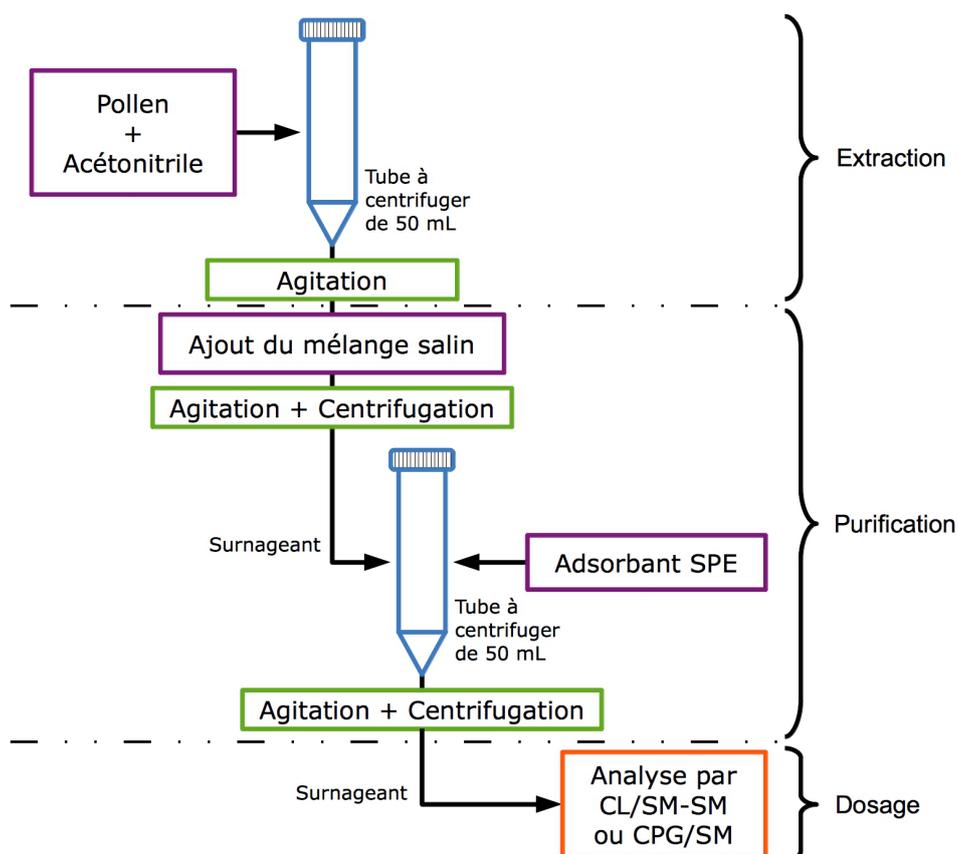


Illustration 9 : Principe de la méthode QuEChERS

Cette méthode a été appliquée dans le cadre d'un dosage multi-résidus de produits phytopharmaceutiques dans le pollen par Wiest *et al.* (2011). Lors de cette étude, la purification par SPE a été réalisée à l'aide d'un support mixte, composé d'un mélange de phase C18 et d'un système PSA, et un lavage de l'extrait à l'hexane a été effectué en sortie d'extraction.

Cette méthode a également été appliquée pour la préparation d'échantillons de pollen en prévision d'un dosage de résidus d'imidaclopride et de ses produits de dégradation (Byrne *et al.*, 2013). Ici, un système PSA a été utilisé pour le remplissage de la colonne-seringue SPE mais aucune étape supplémentaire de purification n'a été mise en œuvre.

7. Extraction et purification simultanées par MSPD

La dispersion de la matrice en phase solide (MSPD ou *matrix solid-phase dispersion* en anglais) repose sur la déstructuration mécanique de la matrice par trituration de celle-ci en présence d'une phase dispersante solide (« phase dispersante A », Illustration 10). Ainsi, les analytes sont extirpés de la matrice pour être adsorbés à la surface des particules entrant dans la composition de la phase dispersante. Ici, la phase ajoutée joue donc un double rôle : celui d'agent abrasif pour rompre la structure des tissus matriciels et celui d'agent de présentation des composés d'intérêt au moment de l'élution. Cette méthode présente l'avantage d'être facile à mettre en œuvre et de ne nécessiter que peu de matériel.

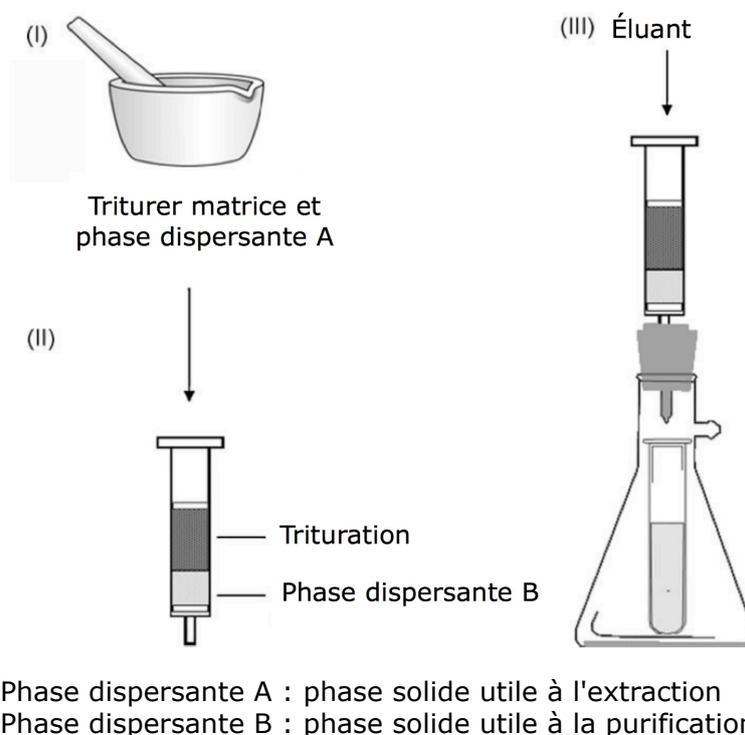


Illustration 10 : Principe d'une méthode MSPD

(Source : Lesellier, « Cours »)

Le Florisil[®], déjà évoqué en tant que phase polaire utile à la rétention des pigments, est employé comme phase adsorbante par divers auteurs (Jiménez *et al.*, 2007 ; Sánchez-Brunete *et al.*, 2008).

Une phase apolaire de type C18 peut également se révéler intéressante. En effet, utilisée comme phase adsorbante en MSPD, la phase C18 permet une extraction efficace des composés à partir d'une matrice riche en composés lipidiques comme le pollen (Capriotti *et al.*, 2010).

Ensuite, après homogénéisation, la trituration est déposée dans une colonne-seringue équipée de filtres. Plusieurs auteurs font le choix d'ajouter une phase dispersante supplémentaire (« Phase dispersante B », Illustration 10), différente de la phase utilisée pour la trituration, au fond de la colonne-seringue. Cette seconde phase dispersante a pour rôle de retenir les composés matriciels. En faisant ainsi, il est possible de combiner extraction et filtration en une seule étape.

Dans cette optique, Vazquez-Quintal *et al.* (2012) ont déposé en fond de colonne une couche de support échangeur d'ions de type PSA pour ses propriétés à adsorber les composés acides issus de la matrice. Pour améliorer la rétention de ces composés, les auteurs ont par ailleurs ajouté un tampon acide.

En dernier lieu, les analytes sont élués par un solvant de polarité intermédiaire, de l'acétonitrile ou de l'acétate d'éthyle selon les études, permettant l'élution des composés d'intérêt tout en minimisant l'élution des composés lipidiques matriciels. À noter que Vazquez-Quintal *et al.* (2012) ont obtenu un extrait plus riche en composés lipidiques lorsque l'acétate d'éthyle était utilisé comme éluant. De plus, afin d'accélérer cette étape, une aspiration par le vide de l'extrait en sortie de colonne-seringue MSPD peut être appliquée. L'éluat ainsi obtenu peut être directement analysé par CL ou CPG mais il peut également être traité par l'une des techniques de purification précédemment présentées avant d'être injecté.

La méthode de préparation par MSPD a prouvé son efficacité tant lors de dosages de résidus de produits phytosanitaires d'un composé ou de plusieurs composés d'une même famille chimique, que lors de dosages multi-résidus (Lozowicka *et al.*, 2012). Une étude a également démontré que le dosage des résidus offrait une meilleure sensibilité lorsque les échantillons étaient traités par MSPD plutôt qu'en ayant recours à une extraction mécanique suivie d'une LLE de purification (Morzycka, 2002).

La méthode d'extraction par MSPD s'est révélée plus efficace pour la préparation des échantillons de pollen en vue d'un dosage des résidus de composés organochlorés, au regard des limites analytiques établies par Vazquez-Quintal *et al.* (2012). Ceci dit, sur l'ensemble des familles chimiques de produits phytosanitaires analysées, des limites analytiques plus basses sont généralement atteintes grâce à la méthode QuEChERS (Wiest *et al.*, 2011).

8. Extraction et purification simultanées par PLE

L'extraction par solvant à chaud et sous pression (PLE ou *pressurized liquid extraction* en anglais) est une méthode d'extraction proposée notamment par Dionex® avec le développement des systèmes ASE (*accelerated solvent extraction* en anglais) (Illustration 11).

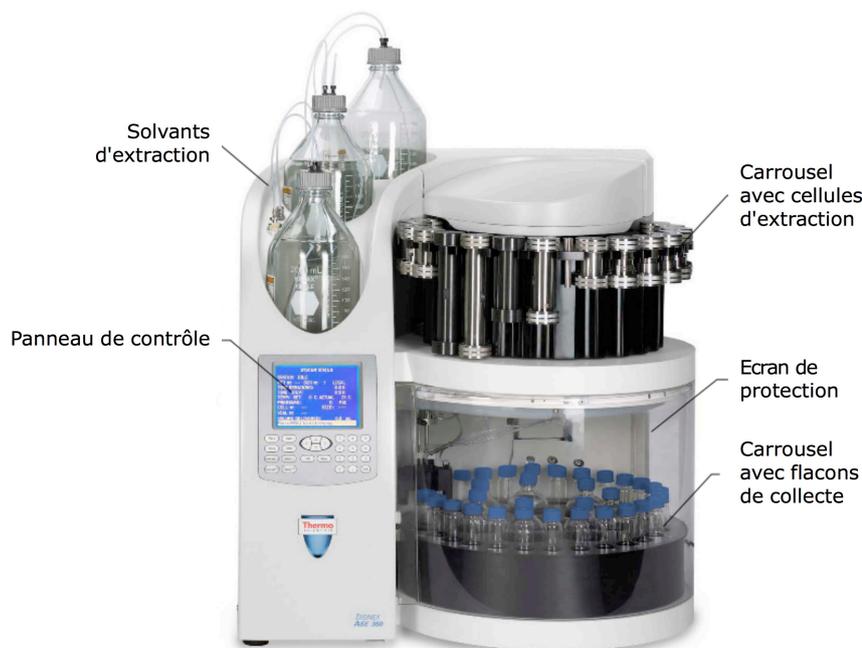


Illustration 11 : Système ASE 350 Dionex®
(Source : Dionex, « ASE 350 Operator's Manual »)

Avec les systèmes ASE Dionex®, les échantillons de pollen dont on souhaite extraire les résidus de produits phytosanitaires sont à placer dans des cellules d'extraction. Ces cellules, dont le volume est à adapter à la masse de pollen à analyser, sont étanches lorsqu'elles sont fermées et sont conçues pour résister à la pression.

La PLE combine une température et une pression élevées afin d'augmenter l'efficacité de l'extraction tout en diminuant significativement les temps d'extraction (Illustration 12). Ils permettent ainsi l'extraction de façon automatisée de molécules à partir d'échantillons solides ou semi-solides.

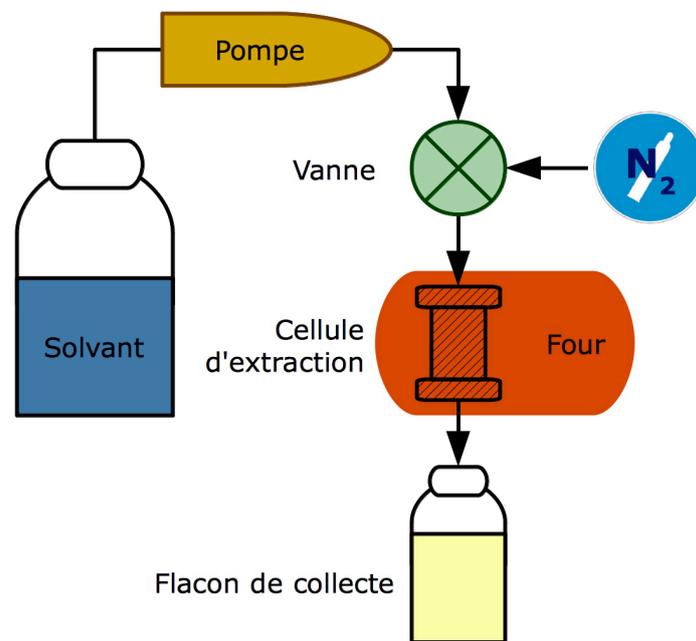


Illustration 12 : Principe d'une méthode PLE

Les arguments avancés par le constructeur de ces systèmes pour expliquer ce perfectionnement de l'extraction sont (Dionex, « Les systèmes ASE® ») :

- une plus forte solubilité de l'analyte dans le solvant,
- une réduction des interactions matrice-analyte,
- une diffusion plus rapide de l'analyte depuis la matrice vers le solvant.

De plus la température élevée diminue la viscosité du solvant, lui conférant ainsi une meilleure pénétration dans la matrice. La qualité de l'extraction est ici encore accrue.

Enfin, l'étanchéité des cellules permet de monter en pression, donc d'élever la température de vaporisation du solvant et de s'assurer que celui-ci soit maintenu en phase liquide pendant toute la durée du processus (Colas, 2006).

Les cellules sont remplies avec les échantillons de pollen à analyser et placées sur le carrousel. Une phase dispersante peut être ajoutée lors du remplissage de la cellule. En fin de cycle, les extraits sont recueillis dans les flacons de collecte. Ainsi, à chaque échantillon correspond une cellule d'extraction et un flacon de collecte.

Au vu de la littérature scientifique, seuls Berrada *et al.* (2010) ont expérimenté une PLE dans le cadre d'une analyse de résidus de produits phytopharmaceutiques dans le pollen. La phase dispersante utilisée lors de cette étude était une phase de type C18, permettant la rétention des composés apolaires issus de la matrice.

Ensuite, l'extrait obtenu peut être purifié grâce à l'une des techniques précédemment présentées avant d'être analysé par CL ou CPG.

9. Dosage des analytes

9.1. Par chromatographie

Les techniques majoritairement utilisées pour le dosage des résidus de produits pharmaceutiques dans le pollen sont la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CL/SM-SM) et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM). Une revue de la littérature réalisée par Alder *et al.* (2006) a montré, que de ces deux techniques, aucune de ne se révélait universelle pour le dosage de l'ensemble des composés. Par conséquent, les deux techniques

sont à appliquer en parallèle : les composés sont ainsi dosés par l'une ou l'autre technique, en fonction de l'efficacité des méthodes de dosages établies par les analystes.

Au travers des différents protocoles présentés précédemment, le solvant le plus communément employé est de loin l'acétonitrile. En effet, il s'agit du solvant d'extraction le plus souvent rencontré dans les études incluant une extraction mécanique et de celui utilisé dans la méthode QuEChERS. Il est aussi utilisé comme éluant pour les purifications par SPE et dans le cadre des extractions par MSPD.

Ainsi, lorsque le dosage est assuré par CL/SM-SM, c'est-à-dire pour la majorité des pesticides (Alder *et al.*, 2006 ; García-Chao *et al.*, 2010), l'extrait obtenu en fin de préparation peut être directement mélangé à la phase mobile pour être injecté dans le système chromatographique. Cependant, il ne peut être fait de même pour un dosage par CPG/SM : une étape d'évaporation de l'acétonitrile avant reprise dans un solvant mieux adapté est ici nécessaire avant injection dans le système chromatographique (Waters, « White Paper »).

9.2. Par bio-essai

Un dosage par bio-essai a été également mis au point : des drosophiles anesthésiées sont disposées sur une surface recouverte du soluté d'extraction contenant l'analyte recherché. La concentration en ce dernier est déduite après enregistrement du taux de mortalité chez les insectes et report sur une courbe dose-réponse préétablie (Choudhary et Sharma, 2007). Cependant, cette technique, ne permettant le dosage que d'un composé unique, n'est pas indiquée dans le cadre d'une analyse multi-résidus.

Matériels et méthodes

1. Présentation

Les échantillons de pollen ont été prélevés dans des exploitations apicoles du Limousin et obtenus par l'intermédiaire d'une association d'apiculteurs, l'ADALim. Les résidus de produits phytopharmaceutiques de cinq échantillons de pollen différents ont été extraits par méthodes QuEChERS et PLE appliquées en parallèle (Illustration 13).

Après extraction, 47 produits phytosanitaires différents ont été identifiés par dosages chromatographiques CL/SM-SM et CPG/SM (Illustration 13). Parmi ces molécules cibles (indications et familles chimiques détaillées en Annexe I), plusieurs insecticides présentent un intérêt particulier au regard d'effets potentiellement néfastes pour les pollinisateurs, dont l'abeille domestique. Ces composés préoccupants pour les apiculteurs sont la cyperméthrine, la deltaméthrine, la lambda-cyhalothrine et la perméthrine pour la famille des pyréthrinoïdes et l'acétamipride, la clothianidine, l'imidaclopride, le thiaclopride et le thiaméthoxame pour la famille des néonicotinoïdes (Tableau 4).

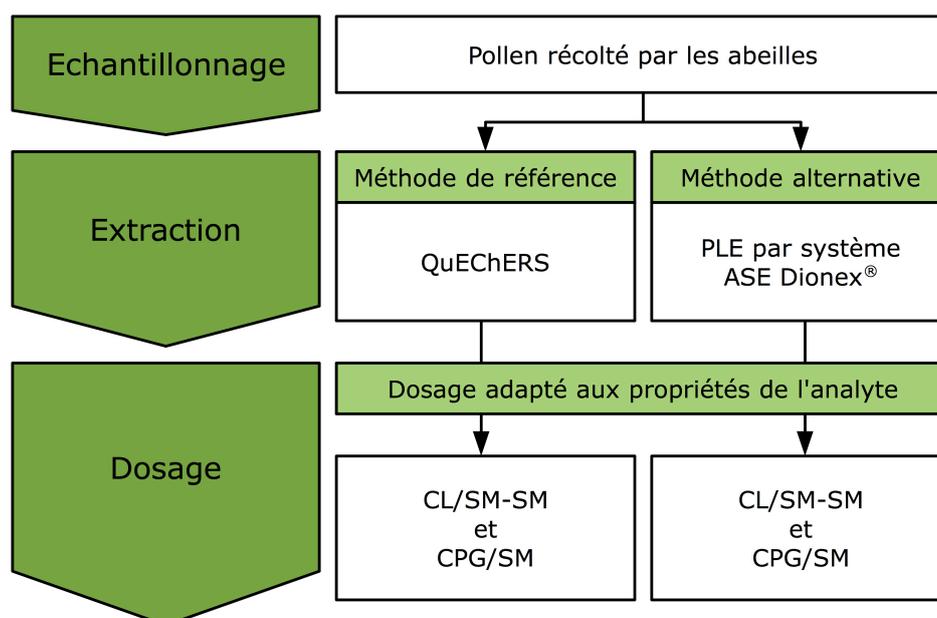


Illustration 13 : Comparaison de deux méthodes d'extraction

Tableau 4 : Molécules extraites des pollens, classées en fonction de la méthode de dosage

Dosage par CL/SM-SM	Dosage par CPG/SM
Acétamipride	Bifenthrine
Atrazine	Captane
Atrazine-déséthyl	Chlorothalonil
Atrazine-désisopropyl	Chlorpyrifos-éthyl
Bupirimate	Cyperméthrine
Carbaryle	Deltaméthrine
Clothianidine	Endosulfan alpha
Cyprodinil	Endosulfan bêta
Diflufénicanil	Endosulfan sulfate
Diméthomorphe	Ethoprophos
Diphénylamine	Folpel
Diuron	Lambda-cyhalothrine
Fenhexamide	Lindane (<i>g</i> -HCH)
Fénoxycarbe	Oxadiazon
Fludioxonil	Parathion-éthyl
Flusilazole	Parathion-méthyl
Hexaconazole	Perméthrine
Imidaclopride	Procymidone
Krésoxym-méthyl	Tolyfluanide
Pirimicarbe	Trifluraline
Propargite	Vinchlozoline
Pyriméthanile	
Tébuconazole	
Thiaclopride	
Thiaméthoxame	
Trifloxystrobine	

En surbrillance : molécules présentant un intérêt particulier pour l'ADALim (Association pour le développement de l'apiculture en Limousin) ; CL/SM-SM : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem ; CPG/SM : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

2. Echantillonnage

Les prélèvements de pollen ont été réalisés à l'aide de trappes à pollen installées en entrée de ruches sur 48 heures. Cinq points de prélèvement, avec plusieurs ruches par emplacement, ont été choisis. Les grains de pollen collectés dans les ruches ont été réunis par point de prélèvement et ainsi, cinq échantillons différents ont été constitués. Les pollens ont ensuite été conservés à -20°C en attendant d'être analysés (modalités de prélèvement en Annexe II).

3. Echantillons traités par méthode QuEChERS

La méthode QuEChERS qui a été appliquée pour l'extraction des résidus de pesticides dans le pollen est fortement inspiré du protocole utilisé pour les matrices alimentaires dans le Secteur de toxicologie agro-alimentaire de l'UF 8880 du laboratoire de Pharmacologie, Toxicologie et Pharmacovigilance du CHU de Limoges.

Pour cause de variations dans le protocole en fonction du système chromatographique utilisé en fin de traitement, la préparation des échantillons de pollen par méthode QuEChERS est présentée en deux sections distinctes pour plus de clarté. La première est consacrée à la préparation des échantillons en vue d'une analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem tandis que la seconde traite de la préparation de ceux destinés à être analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

3.1. Extraction et dosage par CL/SM-SM

Les échantillons de pollen à analyser ont tout d'abord été broyés à l'aide d'un broyeur/mixeur. Puis 2 g de pollen broyés ont été pesés puis placés dans un tube à centrifuger de 50 mL. Ensuite, 50 µL d'une solution d'étalon interne ont été ajoutés ; il s'agissait d'une solution d'albendazole à 1 mg/L dans l'acétonitrile. Enfin, 12 mL d'acétonitrile, le solvant d'extraction, ont été ajoutés.

Après agitation pendant 1 minute, 6,5 g d'un mélange de sels QuEChERS ont été ajoutés. Ce mélange salin contenait du $MgSO_4$, du NaCl et un tampon citrate. Une nouvelle agitation pendant 1 minute et une centrifugation à 3500 tr/min pendant 5 minutes ont suivi. 600 µL du surnageant ont été transférés dans un flacon de 2 mL, complétés avec 600 µL de tampon formiate, et le tout a été homogénéisé par agitation au vortex. Enfin, 2 µL de ce mélange ont été injectés dans le système chromatographique afin d'être analysés.

La séparation chromatographique a été réalisée en phase liquide sur colonne équipée d'un injecteur automatique. Il s'agissait d'une colonne apolaire de type HPLC Ultra Aqueous C18 (RESTEK®) qui présentait pour caractéristiques : 100 mm de longueur et 2,1 mm de diamètre. Le système chromatographique a été couplé à un spectromètre de masse en tandem API 5500 (AB SCIEX®) pour la détection des résidus.

3.2. Extraction et dosage par CPG/SM

Les échantillons de pollen à analyser ont tout d'abord été broyés à l'aide d'un broyeur/mixeur. Puis 2 g de pollen broyés ont été pesés puis placés dans un tube à centrifuger de 50 mL. Ensuite, 50 µL d'une solution d'étalon interne ont été ajoutés ; il s'agissait d'une solution de méphénytoïne à 20 mg/L dans l'eau déminéralisée. Enfin, 10 mL d'acétonitrile, le solvant d'extraction, ont été ajoutés.

Après agitation pendant 1 minute, 6,5 g du mélange de sels déjà cité dans la section précédente ont été ajoutés. Une nouvelle agitation pendant 1 minute et une centrifugation à 3500 tr/min pendant 5 minutes ont suivi.

Dans le but de purifier l'extrait, une extraction en phase solide (SPE) a été appliquée. Ainsi, la phase organique a été transférée dans un second tube à centrifuger de 50 mL contenant 1,5 g de MgSO₄ et 150 mg de silice fonctionnalisée par des amines primaires et secondaires (PSA) comme phase dispersive. Le tube a été agité au vortex pendant 15 secondes puis centrifugé à 3500 tr/min pendant 5 minutes. La phase organique a été transférée dans des tubes de 10 mL pour être évaporée à sec. Le résidu a été repris par 150 µL d'acétate d'éthyle avec agitation au vortex et passage au bain à ultrasons. Après une ultime centrifugation à 3500 tr/min pendant 5 minutes, le surnageant a été transféré dans des flacons adaptés à la CPG/SM. 2 µL ont été injectés pour l'analyse par chromatographie.

La séparation chromatographique a été réalisée en phase gazeuse. Une colonne capillaire apolaire de type FSOT (*fused-silica open tubular*) a été utilisée. Il s'agissait plus précisément d'une colonne PTE 5 (SUPELCO®),

présentant pour caractéristiques : 30 m de longueur, 0,25 mm de diamètre interne et 0,25 µm d'épaisseur de film de phase stationnaire.

Pour la détection des résidus, cette colonne a été couplée à un spectromètre de masse utilisé en mode fragmentométrique (SIM ou *selected ion monitoring* en anglais). L'ionisation des analytes était assurée par impact électronique (EI ou *electron ionization* en anglais).

4. Echantillons traités par méthode PLE (système ASE Dionex®)

Une première étape consistait en la préparation des cellules en vue de l'extraction. Tout d'abord, un filtre a été placé au fond de chaque cellule (Illustration 14). Puis 1 g de Florisil® et 2 g de pollen ont été successivement déposés. Ensuite 50 µL de chaque solution d'étalon interne (une pour les analytes dosés par CL/SM-SM et une pour ceux dosés par CPG/SM) ont été ajoutés aux échantillons et les cellules ont été fermées grâce aux bagues filetées.

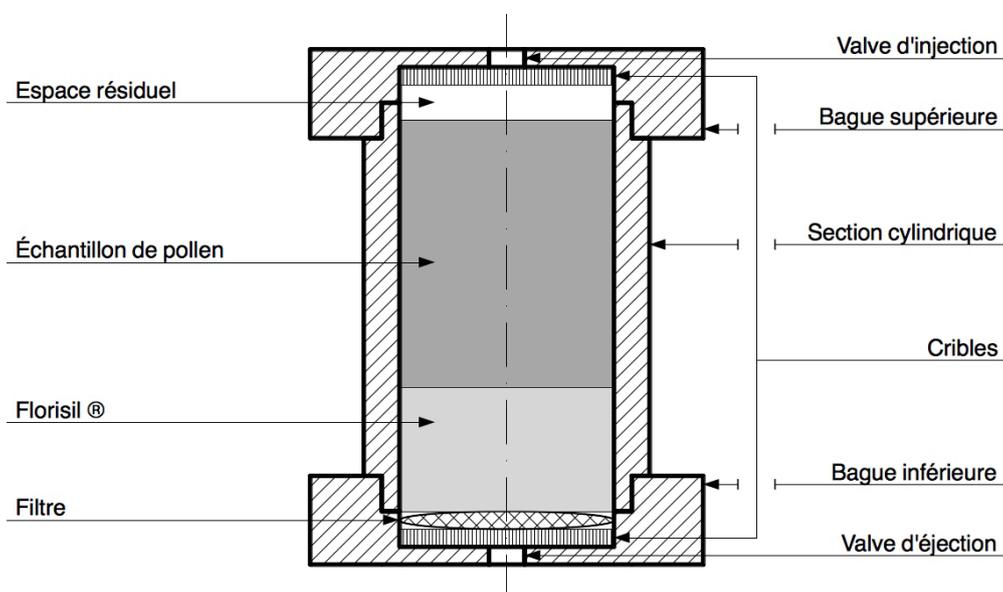


Illustration 14 : Schéma d'une cellule du système ASE Dionex®

Une fois la préparation des cellules d'extraction achevée et celles-ci, ainsi que les flacons de collecte, en place sur l'appareil, l'extraction proprement dite a pu commencer.

L'extraction PLE par système ASE Dionex[®], aux étapes entièrement automatisées (Colas, 2006), s'est déroulée en suivant le protocole ci-dessous :

1. la cellule d'extraction est placée dans le four par le carrousel,
2. l'acétonitrile, le solvant d'extraction, est pompé et injecté dans la cellule,
3. la cellule est chauffée (90°C) et la pression interne augmente (11 bar),
4. le cycle marque une pause : c'est la phase d'extraction,
5. le solvant est éjecté de la cellule et recueilli dans le flacon de collecte,
6. trois cycles d'extraction supplémentaires sont effectués (répétition des étapes 2 à 5),
7. la cellule est purgée de tout solvant par une surpression d'azote,
8. la cellule d'extraction est sortie du four et une nouvelle cellule est présentée.

Ensuite, les contenus des flacons de collecte ont été évaporés à sec puis repris par 150 µL d'acétate d'éthyle avec agitation au vortex et passage au bain à ultrasons. Après centrifugation, la moitié du volume du surnageant a été transférée dans des flacons adaptés à la CPG/SM. 2 µL ont été injectés pour l'analyse par chromatographie. L'autre moitié a subi une nouvelle évaporation à sec puis a été reprise par 100 µL d'un mélange (1:1) d'acétonitrile et de tampon formiate avec agitation au vortex et passage au bain à ultrasons. Ensuite, après une étape de centrifugation, le surnageant a été transféré dans un flacon de 2 mL, et 2 µL ont été injectés pour l'analyse par chromatographie.

Les analyses chromatographiques CL/SM-SM et CPG/SM ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles décrites pour la méthode d'extraction QuEChERS.

5. Détermination des concentrations

Le calcul des concentrations de pesticides dans les échantillons de pollen repose sur la construction d'une gamme d'étalonnage à partir d'une matrice de référence et sur l'ajout d'un étalon interne à chaque échantillon.

5.1. Gamme d'étalonnage

En vue de construire la gamme d'étalonnage, plusieurs concentrations d'une solution contenant toutes les substances de pesticides à rechercher par CL/SM-SM ont été préparées dans l'acétonitrile. Il a été fait de même dans le toluène pour les molécules à rechercher par CPG/SM. De plus, un pollen issu de l'agriculture biologique et acquis dans le commerce a servi de matrice de référence pour constituer la gamme d'étalonnage.

Cette gamme a été construite en 6 points par ajout-dosé d'un volume adéquat d'une solution contenant les analytes recherchés. Un point supplémentaire, sans ajout-dosé, a été réalisé pour le blanc. La série de points ainsi constituée couvrait une gamme de 0 à 250 µg/kg de pollen (Tableau 5).

Tableau 5 : Points de la gamme d'étalonnage

Gamme d'étalonnage (en µg/kg)						
0	0,5	1	5	10	50	250

Pour la méthode QuEChERS, et pour chaque point de la gamme d'étalonnage, deux fois 2 g de pollen préalablement broyés à l'aide d'un broyeur/mixeur ont été pesés puis placés dans deux tubes à centrifuger de 50 mL. Ensuite, ont été ajoutés successivement le volume utile de la solution de dopage et 50 µL de la solution d'étalon interne (pour dosage CL/SM-SM dans l'un et pour dosage CPG/SM dans l'autre). En dernier lieu a été ajouté le solvant d'extraction : 12 mL ou 10 mL pour un dosage par CL/SM-SM ou CPG/SM, respectivement. À partir de cette étape, ces pollens ont été traités selon les protocoles CL/SM-SM et CPG/SM décrits précédemment.

Pour la méthode PLE par système ASE Dionex®, et pour chaque point de la gamme d'étalonnage, une cellule a été remplie comme détaillé précédemment avec un filtre, 1 g de Florisil® et 2 g de pollen. Ensuite, le volume utile de la solution de dopage et 50 µL de chaque solution d'étalon interne ont été successivement déposés. Enfin, toutes les cellules ainsi préparées ont été fermées puis traitées comme les cellules d'échantillon.

5.2. Étalon interne

Cependant, et notamment lorsque la détection des analytes se fait par spectrométrie de masse, il est possible que la réponse du détecteur ne soit pas parfaitement proportionnelle à la concentration de l'analyte cible. L'ajout d'un étalon interne avant traitement des échantillons et des pollens servant à la construction de la gamme standard permet, d'une part de corriger cet écart à la linéarité, et d'autre part de s'affranchir des pertes inhérentes au traitement. L'étalon interne choisi doit à l'idéal ne pas être présent dans l'échantillon et être distinguable des analytes cibles tout en ayant des propriétés physiques et chimiques proches (Burgot et Burgot, 2011).

Deux solutions d'étalon interne ont été préparées : une première d'albendazole à 1 mg/L dans l'acétonitrile et une seconde de méphénytoïne à 20 mg/L dans l'eau déminéralisée pour la CL/SM-SM et la CPG/SM, respectivement.

La détermination de la quantité initiale en analyte est basée sur la relation suivante :

$$Q_a = \frac{I_a}{I_{ei}} \cdot \frac{1}{C_r} \cdot Q_{ei}$$

- avec : Q_a = quantité de l'analyte à doser
 I_a = intensité du signal détecté pour l'analyte
 I_{ei} = intensité du signal détecté pour l'étalon interne
 Q_{ei} = quantité de l'étalon interne (connue)
 C_r = rapport des coefficients de réponse de l'analyte et de l'étalon interne (constante)

En calculant le rapport de la quantité initiale en analyte par la masse de pollen analysée, on déduit la concentration en résidus de produits phytosanitaires présente dans le pollen exprimée en $\mu\text{g}/\text{kg}$.

À noter que les rendements de récupération des analytes de la méthode n'ont pas été calculés. Mais l'ajout de la solution étalon au tout début du protocole d'extraction a permis de s'en affranchir pour la détermination des concentrations.

6. Limites analytiques

Les limites de détection (LDD) et les limites de quantification (LDQ) sont directement dépendantes de la méthode d'extraction utilisée : QuEChERS ou PLE par système ASE Dionex[®]. Les limites analytiques ont été répertoriées dans le tableau 6 pour les analytes dosés par CL/SM-SM et dans le tableau 7 pour ceux dosés en CPG/SM.

Tableau 6 : Limites analytiques (en µg/kg) en CL/SM-SM, extraction par méthodes QuEChERS et PLE par système ASE Dionex®

Molécules	Méthode QuEChERS		Méthode PLE par système ASE Dionex®	
	Limite de détection	Limite de quantification	Limite de détection	Limite de quantification
Acétamipride	0,5	1	0,5	1
Atrazine	1	5	0,25	0,5
Atrazine-déséthyl	5	10	3	5
Atrazine-désisopropyl	5	10	1	5
Bupirimate	0,5	1	0,25	0,5
Carbaryle	0,5	1	Interférences	
Clothianidine	1	5	3	5
Cyprodinil	3	5	Interférences	
Diflufénicanil	1	5	1	5
Diméthomorphe	0,25	0,5	0,25	0,5
Diphénylamine	1	5	Interférences	
Diuron	0,25	0,5	3	5
Fenhexamide	5	10	25	50
Fénoxyarbe	5	10	3	5
Fludioxonil	3	5	1	5
Flusilazole	0,5	1	0,5	1
Hexaconazole	3	5	3	5
Imidaclopride	1	5	1	5
Krésoxym-méthyl	3	5	3	5
Pirimicarbe	0,25	0,5	0,5	1
Propargite	25	50	50	250
Pyriméthanile	1	5	1	5
Tébuconazole	3	5	3	5
Thiaclopride	1	5	3	5
Thiaméthoxame	0,5	1	0,5	1
Trifloxystrobine	1	5	1	5

CL/SM-SM : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem ; QuEChERS : « *quick, easy, cheap, effective, rugged and safe* » ; PLE : « *pressurized liquid extraction* » ; ASE : « *accelerated solvent extraction* ».

Tableau 7 : Limites analytiques (en µg/kg) en CPG/SM, extraction par méthodes QuEChERS et PLE par système ASE Dionex®

Molécules	Méthode QuEChERS		Méthode PLE par système ASE Dionex®	
	Limite de détection	Limite de quantification	Limite de détection	Limite de quantification
Bifenthrine	1	5	5	10
Captane	Interférences		5	10
Chlorothalonil	5	10	0,5	1
Chlorpyrifos-éthyl	1	5	0,25	0,5
Cyperméthrine	Interférences		Interférences	
Deltaméthrine	Interférences		Interférences	
Endosulfan alpha	5	10	3	5
Endosulfan bêta	3	5	3	5
Endosulfan sulfate	1	5	1	5
Ethoprophos	3	5	0,5	1
Folpel	3	5	0,5	1
Lambda-cyhalothrine	1	5	5	10
Lindane (g-HCH)	3	5	0,5	1
Oxadiazon	3	5	3	5
Parathion-éthyl	0,5	1	0,25	0,5
Parathion-méthyl	Interférences		Interférences	
Perméthrine	5	10	25	50
Procymidone	5	10	3	5
Tolylfluanide	Interférences		Interférences	
Trifluraline	0,5	1	0,25	0,5
Vinchlozoline	0,5	1	0,5	1

CPG/SM : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse ; QuEChERS : « *quick, easy, cheap, effective, rugged and safe* » ; PLE : « *pressurized liquid extraction* » ; ASE : « *accelerated solvent extraction* ».

Résultats

1. Limites analytiques obtenues

Pour les substances dosées par CL/SM-SM, les LDD sont comprises entre 0,25 et 5 µg/kg de pollen et entre 0,25 et 3 µg/kg de pollen lors d'une extraction par méthode QuEChERS ou PLE par système ASE Dionex®, respectivement.

Les limites de quantification sont quant à elles comprises entre 0,5 et 10 µg/kg de pollen et entre 0,5 et 5 µg/kg de pollen par extraction QuEChERS ou PLE, respectivement.

Cependant, les limites analytiques de la propargite avec des LDD de 25 et 50 µg/kg et des LDQ de 50 µg/kg et 250 µg/kg par QuEChERS et PLE, respectivement, et du fenhexamide avec une LDD de 25 µg/kg et une LDQ de 50 µg/kg par PLE ne satisfont pas ces critères (Tableau 6).

Des interférences avec la méthode PLE par système ASE Dionex® pour trois molécules – carbaryle, cyprodinil et diphénylamine – ont rendu leur quantification impossible. Des résultats seulement qualitatifs – « présence » ou « absence » – ont pu être obtenus pour celles-ci (Tableau 8).

Pour les substances dosées par CPG/SM, les LDD sont comprises entre 0,5 et 5 µg/kg de pollen et entre 0,25 et 5 µg/kg de pollen lors d'une extraction par méthode QuEChERS ou PLE par système ASE Dionex®, respectivement.

Concernant les limites de quantification, celles-ci sont comprises entre 1 et 10 µg/kg de pollen et entre 0,5 et 10 µg/kg de pollen par extraction QuEChERS ou PLE, respectivement.

Cependant, les limites analytiques du dosage des résidus de perméthrine lorsqu'elle est extraite par méthode PLE ne répondent pas à ces critères : LDD = 25 µg/kg et LDQ = 50 µg/kg (Tableau 7).

Des interférences pour la cyperméthrine, la deltaméthrine, le parathion-méthyl et le tolylfluanide avec les deux méthodes d'extraction et pour le captane uniquement dans le cas de la méthode QuEChERS ont rendu leur quantification impossible. Quand ce désagrément s'est produit, seuls des résultats qualitatifs ont pu être obtenus (Tableau 8).

2. Dosage des pesticides dans les pollens

Les résultats des dosages des résidus de produits phytosanitaires dans les pollens sont fournis dans le tableau 8. Le dosage des résidus a révélé un nombre important de concentrations inférieures aux LDD. Pour faciliter la lecture des résultats, les molécules qui ont été décelées (concentrations inférieures aux LDD) dans aucun des cinq échantillons de pollen et quelle que soit la méthode d'extraction appliquée n'ont pas été incluses dans ce tableau.

Seuls la diphenylamine, la trifloxystrobine et le tolylfluanide ont été retrouvés dans tous les échantillons de pollen, par méthode PLE pour les deux premiers composés et par les deux méthodes pour le troisième. La méthode PLE a permis de mettre en évidence la présence de chlorothalonil et de cyprodinil dans plusieurs échantillons. Au contraire, c'est grâce à la méthode QuEChERS qu'une part importante d'échantillons a été révélée positive pour la deltaméthrine.

Les autres composés n'ont été décelés que ponctuellement par les deux méthodes d'extraction dans le cas du carbaryle et du thiaclopride, ou par l'une ou l'autre méthode pour les molécules restantes : acétamipride, atrazine-déséthyl, bupirimate, diméthomorphe, flusilazole et thiaméthoxame.

Enfin, comme déjà évoqué dans la section précédente, des interférences ont empêché la quantification de quelques résidus. Lorsque ce phénomène s'est produit, des résultats qualitatifs sont fournis : « présence » ou « absence » pour des concentrations supérieures ou inférieures aux LDD, respectivement.

Tableau 8 : Résultats (en µg/kg) supérieurs aux LDD obtenus pour chaque échantillon de pollen, en fonction de la méthode d'extraction

Échantillons →	1 ^{er} point de prélèvement			2 ^e point de prélèvement	
	Pollen 1	Pollen 2	Pollen 3	Pollen 4	Pollen 5
Molécules analysées ↓	Résultats obtenus par méthode QuEChERS				
	Résultats obtenus par méthode PLE par système ASE Dionex®				
Acétamipride	< LDQ (0,89)	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD
	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD
Atrazine-déséthyl	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD	11,62
	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD
Bupirimate	1,15	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD
	1,15	< LDD	< LDD	< LDD	2,50
Carbaryle	< LDQ (0,88)	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD
	Présence	Absence	Absence	Absence	Absence
Chlorothalonil	< LDD	445 *	68	< LDD	< LDD
	4,40	63,76	25,59	< LDD	< LDD
Cyprodinil	< LDQ (3,16)	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD
	Présence	Présence	Absence	Présence	Présence
Deltaméthrine	Présence	Présence	Présence	Absence	Absence
	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence
Diméthomorphe	0,85	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD
	< LDD	1,29	< LDD	< LDD	< LDD
Diphénylamine	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD
	Présence	Présence	Présence	Présence	Présence
Flusilazole	1,23	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD
	< LDD	3,14	< LDD	< LDD	< LDD
Thiaclopride	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD	26,20
	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD	8,10
Thiaméthoxame	1,58	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD
	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD
Tolyfluanide	Présence	Présence	Présence	Présence	Présence
	Présence	Présence	Présence	Présence	Présence
Trifloxystrobine	1,90	< LDD	< LDD	< LDD	< LDD
	< LDQ (0,99)	10,15	8,86	4,25	6,23

* Hors gamme de quantification ; LDD : limite de détection ; QuEChERS : « quick, easy, cheap, effective, rugged and safe » ; PLE : « pressurized liquid extraction » ; ASE : « accelerated solvent extraction ».

Discussion

1. Critique de la matrice d'étude

Plusieurs matrices liées aux abeilles sont disponibles pour la recherche des produits phytosanitaires : le nectar, le miel, le pollen, le pain d'abeille et la cire d'abeille. Des dosages peuvent également être effectués directement dans les corps d'abeilles ou de larves.

Le choix de la matrice est intrinsèquement lié à l'objectif visé par l'étude.

Réaliser une analyse résiduelle directement dans les corps d'abeilles peut être un bon indicateur de la pollution environnementale en produits phytosanitaires (Chauzat *et al.*, 2006). En effet, les abeilles récoltent le pollen pouvant contenir des résidus de pesticides mais captent également les aérosols de produits phytosanitaires sur leurs poils et dans leur trachée (Chauzat *et al.*, 2011).

Le miel est un substrat animal régi par les lois européennes concernant les produits destinés à la consommation humaine. Dans ce cadre, de nombreux contrôles sanitaires construits sur des protocoles analytiques bien établis sont ainsi régulièrement effectués : recherche de résidus de produits phytosanitaires, de métaux lourds et d'antibiotiques (DGAL, « Bilan 2011 »). Les auteurs d'une revue de la littérature ont mis en évidence le nombre important d'études portant sur cette matrice (Rial-Otero *et al.*, 2007).

L'abeille butine les fleurs afin de récolter nectar et pollen.

Le nectar sert de base pour la fabrication du miel alors que le pollen est un aliment consommé par la colonie. Une analyse du nectar renseigne donc sur l'exposition des consommateurs de miel et des butineuses aux résidus de produits phytosanitaires. En outre, comme l'a montré une étude récemment

publiée, les substances chimiques organiques ont tendance à se concentrer au fil de la maturation du nectar en miel (Byrne *et al.*, 2013).

Les abeilles imbibent de sécrétions salivaires le pollen stocké au sein de la ruche et le laissent fermenter. Ainsi se forme doucement le pain d'abeille qui sert de base d'alimentation pour les abeilles et le couvain (Chauzat *et al.*, 2006), notamment comme source de protéines (ANSES, 2013 ; Mullin *et al.*, 2010).

Par conséquent, l'étude du pollen récolté par les abeilles est pleinement justifiée afin de renseigner le volet expologie des abeilles aux produits phytosanitaires, à doses sublétales et en terme d'exposition au long cours, au sein de la ruche.

Néanmoins, Mullin *et al.* (2010) rappellent que les abeilles mortes suite à un empoisonnement par exposition à des doses létales lors du butinage de pesticides ne reviennent pas à la ruche. Ainsi, lorsqu'un prélèvement de pollen en entrée de ruche est mis en œuvre, un échappement des taux les plus élevés est donc à craindre, de même qu'une sous-estimation de la contamination réelle de l'environnement. Le pollen récolté par les abeilles ne constitue donc pas une matrice idéale pour l'évaluation des risques liés à une exposition aiguë aux produits phytosanitaires.

Enfin, l'évaluation de l'exposition aux résidus de pesticides des abeilles par le pollen récupéré à l'aide de trappes à pollen à l'entrée de la ruche connaît une autre limite. Comme elle est récoltée en entrée de ruche, cette matrice n'apporte pas de renseignement sur l'exposition des abeilles aux pesticides utilisés par les apiculteurs. Ces traitements « *in hive* » sont principalement des acaricides utilisés dans la lutte contre le *Varroa*, un parasite des hyménoptères. Or, lors de plusieurs études sur l'exposition aux pesticides des abeilles domestiques, les plus hautes concentrations mesurées concernaient les-dits traitements acaricides (Wiest *et al.*, 2011). Ce constat s'est révélé encore plus frappant lors de la pratique de la transhumance des ruchers (Bernal *et al.*, 2010).

2. Critique de la méthode

2.1. Prélèvement et conservation des échantillons

Des précautions de conservation doivent être prises afin d'éviter la dégradation avant analyse des pesticides, notamment des molécules photosensibles (Chauzat *et al.*, 2006). Concernant la température de stockage, une étude récente portant sur un test de conservation des échantillons de pollen a démontré leur stabilité à -18°C pendant 2 ans (Wiest *et al.*, 2011). D'après les modalités de prélèvement fournies par l'ADALim (en Annexe II), de bonnes conditions de manipulation (gants et matériel propre) et de conservation (à -20°C et à l'abri de la lumière) ont été respectées. Par conséquent, des désagréments tels que des contaminations extérieures (surévaluation des concentrations en résidus) ou une dégradation des échantillons (sous évaluation des concentrations en résidus) ne semblent pas à craindre.

Cependant, une altération du comportement des abeilles butineuses a déjà été remarquée suite à l'installation de trappes à pollen en entrée de ruche (Chauzat *et al.*, 2011), sans en préciser l'ampleur. Ce phénomène mal décrit dans la littérature scientifique ne peut être ignoré et doit être considéré comme une source d'erreur potentielle dans l'évaluation de l'exposition de la ruche aux produits phytosanitaires.

Afin de limiter cet aléa, il est conseillé de limiter les temps de prélèvement. Ainsi le trouble occasionné chez les abeilles serait minimisé. Dans ce but, les prélèvements sont effectués sur des périodes relativement courtes : entre 24 heures (Byrne *et al.*, 2013) et 3 jours (Chauzat *et al.*, 2011). Il peut être nécessaire de les renouveler afin d'obtenir une quantité de pollen suffisante pour les analyses. Le temps précisé par l'ADALim, 48 heures, est en parfait accord avec ces recommandations.

2.2. Limitation de l'effet matriciel

Une purification de l'extrait permet de limiter la teneur en composés issus de la matrice dans l'extrait, et ainsi de limiter l'effet matriciel, ou « bruit de fond », pendant le dosage par chromatographie.

La construction d'une gamme d'étalonnage calibrée sur la matrice d'étude (ou *matrix-matched calibration* en anglais) participe également à contourner cet effet matriciel (Pareja *et al.*, 2011). Pour rappel, la gamme d'étalonnage a été construite par ajouts-dosés des analytes recherchés sur une matrice de référence. Ces échantillons, constituant les points de la gamme, ont ensuite été traités en suivant le même protocole que les échantillons de pollen à analyser. Par conséquent, l'effet matriciel subi lors du dosage de ces points de gamme est le même que celui des échantillons, et la quantification est ajustée sur l'effet matriciel.

Une précédente étude sur l'analyse de pesticides dans le miel et le pollen a montré que les droites de quantification ainsi construites permettaient de contourner efficacement l'effet matriciel résiduel (García-Chao *et al.*, 2010). Mais il est impératif que la matrice de référence choisie soit semblable à la matrice d'étude (Wiest *et al.*, 2011). Un pollen issu de l'agriculture biologique et acquis dans le commerce a donc été utilisé comme matrice de référence. Au vu de la littérature, les auteurs sont nombreux à procéder ainsi (Berrada *et al.*, 2010 ; Bonmatin *et al.*, 2003 ; Dively et Kamel, 2012).

Cependant, la présence de traces de résidus dans le pollen utilisé comme matrice de référence pour la construction des gammes d'étalonnage est suspectée. À cause de cet inconvénient, déjà décrit par Bonmatin *et al.* (2003), des droites de quantification justes n'ont pu être obtenues.

Sur le nombre total d'interférences recensées, deux sont dues vraisemblablement à la présence de pesticides dans la matrice de référence : celles observées pour le parathion-méthyl et le tolylfluanide.

De plus, trois résidus sont suspectés d'être également présents dans le pollen utilisé comme matrice de référence : le carbaryle, le cyprodinil et la diphénylamine. Cependant, un doute persiste compte tenu que ces

interférences se sont produites uniquement avec la méthode PLE et non avec la méthode QuEChERS. Une contamination du pollen de la cellule d'extraction ASE Dionex® ayant servi à la construction du blanc pendant les manipulations peut être suspectée.

Enfin, des interférences matricielles ont perturbé le dosage par CPG/SM après extraction par méthode QuEChERS. De ce fait, la quantification a été rendue impossible pour trois produits phytopharmaceutiques supplémentaires : le captane, la cyperméthrine et la deltaméthrine. La présence de composés issus du pollen, non éliminés de l'extrait lors de la purification, est ici envisagée.

2.3. Extraction des pesticides et purification de l'extrait

Les échantillons ont été préparés en vue d'un dosage des résidus de produits phytopharmaceutiques en suivant deux protocoles en parallèle. Le premier était basé sur la méthode de référence QuEChERS tandis que le second consistait en une méthode alternative incluant une PLE.

D'une part, la purification appliquée dans le cadre de la méthode QuEChERS ciblait les acides gras et les sucres issus de la matrice par l'intégration d'un support échangeur d'ions de type PSA comme phase dispersante de la SPE. Au regard de la littérature, l'emploi de cette phase est fréquent et son efficacité a été démontrée.

Une étude portant sur la préparation des échantillons de pollen en vue d'un dosage des résidus d'organochlorés a comparé les supports PSA et GCB. Elle a permis de confirmer le bénéfice apporté par l'utilisation de ces supports en tant que phases adsorbantes de purification. Mais les auteurs, Vazquez-Quintal *et al.* (2012) ont noté des rendements d'extraction moins bons avec le carbone graphite. Ils suspectent une probable rétention d'une partie des analytes par adsorption sur ce dernier. Une autre étude, portant sur un dosage multi-résidus dans le pollen, a également mis en avant de moins bons rendements d'extraction lors de l'emploi d'un support GCB, voire médiocres pour des composés très apolaires (Wiest *et al.*, 2011). Au contraire, le système

PSA, de par sa nature, entraîne une perte en analytes possédant une fonction acide. Pour cette raison, le dosage de l'acide-6-chloronicotinique, métabolite de l'imidaclopride, est impossible avec un système PSA (Pareja *et al.*, 2011).

Comme le dosage multi-résidus présenté dans le cadre de cette thèse n'incluait pas l'acide-6-chloronicotinique, le choix du système PSA semble pertinent. Ceci dit, des auteurs ont expérimenté une méthode QuEChERS modifiée en utilisant pour phase dispersante le mélange d'une phase apolaire de type C18 et d'un support échangeur d'anions de type PSA (Wiest *et al.*, 2011). Une étude récente a d'ailleurs démontré le bénéfice apporté par l'usage d'un mélange de ces deux phases plutôt qu'un système PSA seul (Pareja *et al.*, 2011).

Les problèmes liés aux interférences ont été nombreux lors du dosage par CPG/SM suite à une extraction des pesticides des pollens par application de la méthode QuEChERS (cas du captane, de la cyperméthrine et de la deltaméthrine déjà évoqués).

L'expérimentation d'une SPE avec un mélange de PSA et C18 pourrait permettre de limiter d'avantage le « bruit de fond » lié aux composés matriciels lors de la détection et ainsi de limiter les interférences. En parallèle, ce support mixte offrirait potentiellement un dosage plus sensible pour l'ensemble des analytes d'intérêt.

D'autre part, l'étape de purification avec la méthode alternative incluant une PLE par système ASE Dionex[®] fut réalisée conjointement à l'extraction. En effet, lors de la préparation des cellules d'extraction du système ASE Dionex[®], du Florisil[®] a été utilisé comme phase dispersante. Pour rappel, cette phase est intéressante pour sa capacité à retenir les composés matriciels polaires tels que les pigments.

Une équipe scientifique s'est penchée sur l'optimisation du remplissage de la cellule d'extraction d'un système ASE Dionex[®] (Berrada *et al.*, 2010). Les auteurs ont pu apprécier au cours de leurs travaux l'importance du rapport des masses d'échantillons et de phase dispersante à déposer dans la cellule. En effet, la quantité de phase solide doit être suffisante pour retenir les composés issus de la matrice sans retenir les analytes d'intérêt.

Par ailleurs, une étude portant sur les phases solides employées pour la préparation des échantillons de pollen par MSPD en prévision d'un dosage de résidus de produits phytopharmaceutiques a déjà été menée (Sánchez-Brunete *et al.*, 2008). Les auteurs ont étudié trois phases adsorbantes très utilisées pour le remplissage de ces colonnes (une phase C18, l'alumine et le Florisil®) et ont remarqué que les interférences étaient nettement diminuées lorsque la phase dispersante était le Florisil®. Le choix du Florisil® comme phase dispersante en PLE pourrait donc permettre de limiter les étapes de purification. D'ailleurs, Berrada *et al.* (2010) s'étaient affranchi de toute étape de purification en aval de l'extraction par méthode PLE.

Aucune étape de purification supplémentaire de l'extrait n'était prévue dans le protocole présenté dans cette thèse. Par conséquent, mis à part ceux retenus par le Florisil®, l'extrait n'a pas été purifié avant injection des composés qui auraient pu être extraits de la matrice conjointement aux analytes.

À noter que l'application d'une méthode PLE à la matrice pollen est très peu documentée dans la littérature scientifique. La proportion de composés issus de la matrice pollen par cette méthode d'extraction est par conséquent imprévisible. Ceci dit, aucune interférence n'a compromis le dosage des pesticides des échantillons de pollen traités par PLE malgré l'absence d'étape de purification supplémentaire.

Le bénéfice d'une optimisation du rapport des masses d'échantillon de pollen et de phase dispersante à déposer dans la cellule et de l'ajout d'une étape de purification subsidiaire serait à évaluer. En effet, par l'obtention d'un extrait plus pur, le dosage pourrait se révéler plus sensible.

3. Critique des limites analytiques

Les LDD établies par méthode QuEChERS sont comprises entre 0,25 et 5 µg/kg de pollen sur l'ensemble des molécules, mise à part la propargite. En comparaison aux LDD disponibles dans la littérature pour un dosage multi-résidus de produits phytosanitaires dans le pollen, ces limites analytiques sont équivalentes (Bernal *et al.*, 2010 ; Mullin *et al.*, 2010) voire meilleures (Chauzat *et al.*, 2006 ; Chauzat *et al.*, 2011 ; Wiest *et al.*, 2011).

De plus, les LDD établies par méthode PLE sont comprises entre 0,25 et 5 µg/kg, si on fait abstraction des trois molécules qui ont posé problème (le fenhexamide, la perméthrine et la propargite). Ces valeurs sont bien inférieures à celles présentées dans une précédente étude, portant sur l'analyse multi-résidus de produits phytopharmaceutiques extraits des pollens par PLE. Les limites de détection publiées par les auteurs s'évaluaient de 5 à 15 µg/kg de pollen (Berrada *et al.*, 2010).

Ceci dit, toutes ces valeurs demeurent supérieures aux limites analytiques parfois atteintes – de l'ordre du dixième de µg/kg de pollen – lors de dosages spécifiques d'un analyte ou de plusieurs analytes d'une même famille chimique.

Les limites analytiques étant plus élevées lors d'un dosage multi-résidus, un échappement des analytes à l'état de traces dans les échantillons peut avoir lieu.

Par ailleurs, les limites analytiques établies dans les deux méthodes de préparation des échantillons sont globalement équivalentes : entre 0,25 et 5 µg/kg pour les LDD et entre 0,5 et 10 µg/kg pour les LDQ, à quelques exceptions près, dans les deux cas. Néanmoins, plusieurs variations sont remarquables.

Ainsi, si l'on compare les limites analytiques propres à chaque molécule, il apparaît qu'en réalité, elles ne sont égales entre les deux méthodes de préparation des échantillons que pour quinze pesticides (« jaune », Illustration 15). Les molécules concernées sont les suivantes :

acétamipride, diflufénicanil, diméthomorphe, endosulfan bêta, endosulfan sulfate, flusilazole, hexaconazole, imidaclopride, krésoxym-méthyl, oxadiazon, pyriméthanile, tébuconazole, thiaméthoxame, trifloxystrobine et vinchlozoline.

Limites analytiques

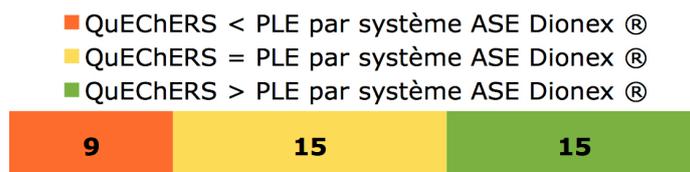


Illustration 15 : Comparaison des limites analytiques et nombre de molécules

Dans les autres cas, la sensibilité du dosage est meilleure, c'est-à-dire que des limites analytiques plus basses ont été atteintes,

tantôt par méthode QuEChERS (« orange », Illustration 15) :

bifenthrine, clothianidine, diuron, fenhexamide, lambda-cyhalothrine, perméthrine, pirimicarbe, propargite et thiaclopride,

tantôt par PLE par système ASE Dionex® (« vert », Illustration 15) :

atrazine, atrazine-déséthyl, atrazine-désisopropyl, bupirimate, chlorothalonil, chlorpyriphos-éthyl, endosulfan alpha, éthoprophos, fénoxy-carbe, fludioxonil, folpel, lindane, parathion-éthyl, procymidone et trifluraline.

Par conséquent, l'équivalence entre les deux méthodes ne peut être réellement affirmée. Au contraire, l'une et l'autre se révèlent plus ou moins efficaces selon analyte recherché. Les limites analytiques pour le dosage des composés organochlorés et organophosphorés sont, sans exception, soit équivalentes soit plus basses par méthode d'extraction PLE par système ASE Dionex®.

À présent, considérons plus particulièrement les composés pyréthri-noïdes et néonicotinoïdes, les deux familles les plus préoccupantes pour les pollinisateurs. La préparation des échantillons selon la méthode QuEChERS semble, dans les conditions expérimentales définies, mieux adaptée au dosage de ces résidus que la préparation des échantillons par PLE. En effet, les limites analytiques sont soit équivalentes – acétamipride, imidaclopride et thiaméthoxame – soit plus basses – bifenthrine, clothianidine, lambda-cyhalothrine, perméthrine et thiaclopride – avec la méthode QuEChERS.

Les limites analytiques de la perméthrine sont singulièrement élevées lors d'une extraction PLE par système ASE Dionex® (QuEChERS : LDD = 5 µg/kg, LDQ = 10 µg/kg ; PLE : LDD = 25 µg/kg, LDQ = 50 µg/kg). Parallèlement, les limites analytiques de la bifenthrine et de la lambda-cyhalothrine, deux autres composés de la famille des pyréthriinoïdes, sont également parmi les plus hautes lors d'une préparation de l'échantillon par PLE par système ASE Dionex® (LDD = 5 µg/kg, LDQ = 10 µg/kg). À ceci s'ajoute une incertitude quant à l'extraction de la cyperméthrine et de la deltaméthrine par PLE. En effet, ces analytes n'ont pas du tout été détectés en aval de cette méthode, qu'il s'agissait d'échantillons de pollen à analyser ou de pollens dopés pour la construction de la gamme d'échantillonnage.

Plusieurs explications peuvent être avancées pour expliquer ceci : soit les pyréthriinoïdes sont difficilement extraits de la matrice pollen, soit les pyréthriinoïdes sont trop fragiles pour subir les conditions imposées par une méthode PLE, soit les conditions expérimentales de la PLE qui ont été appliquées ne sont pas adaptées à cette famille chimique. Cependant, la préparation des échantillons par QuEChERS ayant offert des limites analytiques satisfaisantes pour la bifenthrine, la lambda-cyhalothrine et la perméthrine, la première hypothèse peut être écartée.

Au vu de ces constatations, la méthode d'extraction par solvant à chaud et sous pression ou les conditions expérimentales définies pour cette méthode semblent ne pas convenir au dosage des pyréthriinoïdes.

L'écart entre les limites analytiques établies pour les composés de la famille des néonicotinoïdes est moins marqué entre les méthodes QuEChERS et PLE que pour les pyréthriinoïdes. Les LDD et LDQ atteintes sont en effet égales ou légèrement plus élevées par PLE.

Le protocole expérimental appliqué par PLE peut potentiellement expliquer ce phénomène. En effet, lors de la préparation des cellules d'extraction du système ASE Dionex®, du Florisil® a été utilisé comme phase dispersante. Or, les néonicotinoïdes étant des composés relativement polaires, il est possible qu'une partie des analytes appartenant à cette famille soit restée adsorbée à la surface des particules de Florisil®.

Ceci pourrait expliquer une légère perte en sensibilité pour les représentants de cette famille chimique par rapport à la méthode QuEChERS qui n'incluait pas de phase dispersante polaire.

Enfin, les LDD et LDQ sont notoirement plus élevées pour deux autres molécules : la propargite et le fenhexamide. Les limites analytiques sont en effet supérieures à celles annoncées précédemment avec les deux méthodes d'extraction pour la première molécule et uniquement dans le cas d'une extraction par PLE pour la seconde. À noter que la propargite et le fenhexamide sont des composés n'appartenant pas aux grandes familles chimiques des pesticides. La propargite est un sulfite d'ester utilisé comme acaricide tandis que le fenhexamide, aux propriétés antifongiques, est le seul représentant de la famille des hydroxyanilides.

Il est envisageable que ces composés singuliers nécessitent des conditions pré-analytiques particulières.

Concernant la propargite, il peut s'agir d'un composé difficilement extractible du pollen au vu des limites analytiques obtenues avec les deux méthodes d'extraction (QuEChERS : LDD = 25 µg/kg, LDQ = 50 µg/kg ; PLE : LDD = 50 µg/kg, LDQ = 250 µg/kg). Wiest *et al.* (2011) avaient déjà noté des limites analytiques anormalement élevées pour cette molécule lors d'un dosage multi-résidus dans le pollen.

Quant à la molécule du fenhexamide, elle est peut-être trop fragile pour subir les conditions de température et de pression imposées par une extraction PLE, vu les limites analytiques établies avec cette méthode en comparaison à celles atteintes par méthode QuEChERS (QuEChERS : LDD = 5 µg/kg, LDQ = 10 µg/kg ; PLE : LDD = 25 µg/kg, LDQ = 50 µg/kg).

4. Critique des résultats

4.1. Validité des résultats

Les abeilles peuvent parcourir un rayon géographique variable pour la récolte du pollen et du nectar des fleurs. En effet, les abeilles sont capables de s'éloigner à plus de 10 km de la ruche. Toutefois, le rayon de vol moyen se situe généralement autour de 6 kilomètres, distance qui peut être réduite à quelques centaines de mètres lors d'une riche disponibilité en pollen et nectar à proximité de la ruche (Beekman et Ratnieks, 2000).

De plus, les variétés de pollen disponibles pour les butineuses diffèrent au cours de l'année en fonction des périodes de floraison des diverses espèces végétales.

Par conséquent, les pollens récoltés et apportés à la ruche par les abeilles ont des origines florales très variées (ANSES, 2013) : de cultures traitées par des pesticides, de cultures non traitées ou d'espèces sauvages. À noter qu'il a été remarqué que les abeilles manifestaient une préférence pour les pollens riches en lipides (ANSES, 2013) (Somerville, 2006) tels que le pollen de colza (Choudhary et Sharma, 2007).

En conclusion, les concentrations mesurées par analyse du pollen peuvent être très variables d'un grain de pollen à un autre. Afin de préserver la validité du dosage, il est préférable que les échantillons de pollen analysés soient homogénéisés avant traitement.

Dans cet objectif, certains auteurs font le choix de pulvériser une grande quantité de pollen. La quantité de pollen analysée, ou prise d'essai, est ensuite sélectionnée parmi ce pollen pulvérisé (Chauzat *et al.*, 2011). La qualité de l'évaluation de l'exposition moyenne aux produits phytosanitaires des colonies d'abeilles domestiques est ainsi améliorée.

Dans le même but, d'autres auteurs ont proposé d'augmenter la prise d'essai de pollen pour les analyses (Kadar et Faucon, 2006). Cependant, cette technique est controversée par Pareja *et al.* (2011) qui ont montré que les interférences matricielles étaient proportionnellement aggravées avec l'augmentation de la prise d'essai.

Le protocole défini pour l'extraction PLE par système ASE Dionex® précisait une prise d'essai de 2 g mais ne comprenait aucune étape de broyage des sacs polliniques avant extraction.

À noter que tous les résultats présentés ici ont été obtenus par un unique dosage. Un second dosage sur les mêmes échantillons aurait été nécessaire afin de confirmer ces données.

4.2. Variabilité des résultats obtenus

Sur 47 produits phytosanitaires, seules 14 molécules ont été détectées au moins une fois parmi les cinq échantillons (Tableau 8).

On remarque la présence constante de la deltaméthrine et quasi-constante du chlorothalonil dans les échantillons 1, 2 et 3 et leur absence dans les échantillons 4 et 5 (Tableau 8). Ceci peut s'expliquer par la provenance des-dits échantillons (Annexe II). En effet, les trois premiers échantillons proviennent d'un même point de prélèvement tandis que les deux derniers proviennent d'un second point de prélèvement. Manifestement, par leur situation géographique, seules les ruches du premier point de prélèvement étaient exposées au chlorothalonil et à la deltaméthrine.

Au contraire, le numéro 5 est le seul échantillon au sein duquel le thiaclopride ait été détecté, et ceci à des concentrations élevées (Tableau 8). Les échantillons de pollen 4 et 5 ayant été prélevés à deux semaines d'intervalle (Annexe II), la détection de thiaclopride dans l'échantillon 5 et non dans le 4 traduit vraisemblablement la réalisation d'un traitement par cet insecticide entre les deux prélèvements.

De même, le carbaryle a été détecté uniquement dans l'échantillon numéro 1, quelle que soit la méthode d'extraction mise en œuvre (Tableau 8). Ceci traduit probablement un traitement des cultures à proximité de la ruche antérieur au premier prélèvement. Par dégradation de ce composé dans l'environnement, il n'était plus détectable dans les échantillons 2 et 3 aux limites analytiques établies.

On note également que la détection n'est pas toujours concordante entre les deux méthodes d'extraction.

Par exemple, l'acétamipride, le diméthomorphe, le flusilazole et le thiaméthoxame ont été détectés ponctuellement, en aval de l'une ou l'autre méthode d'extraction (Tableau 8). Pourtant, les limites analytiques établies pour ces composés chimiques sont strictement les mêmes entre les méthodes QuEChERS et PLE par système ASE Dionex® (Tableau 6). Une variation de sensibilité ne peut donc être invoquée dans ce cas.

Cependant, on remarque que les concentrations mesurées sont relativement faibles : à l'état de traces (concentrations comprises entre la LDD et la LDQ) pour l'acétamipride et le diméthomorphe et de l'ordre du $\mu\text{g}/\text{kg}$ de pollen pour le flusilazole et le thiaméthoxame. En d'autres termes, les concentrations auxquelles ces molécules ont été détectées étaient proches de la limite de détection.

Ainsi, un manque d'homogénéité dans les échantillons de pollen pourrait expliquer que ces composés aient été détectés par application de l'une des méthodes d'extraction et non par l'autre. Un broyage des sacs polliniques avant extraction par méthode PLE aurait offert une meilleure homogénéité des échantillons. De cette façon, la concordance entre les résultats obtenus avec l'une et l'autre méthode d'extraction aurait peut-être été améliorée.

Par ailleurs, l'atrazine-déséthyl a été quantifiée à $11,62 \mu\text{g}/\text{kg}$ de pollen au sein de l'échantillon numéro 5, mais uniquement en aval d'une extraction par méthode QuEChERS. Il s'agit néanmoins d'une concentration élevée au regard des concentrations enregistrées avec les autres analytes. Ce constat soulève une interrogation.

En effet, la Commission Européenne a décidé le retrait de toute préparation phytosanitaire incluant de l'atrazine dans les Etats-membres en 2004. Il est donc surprenant de détecter un produit de dégradation de l'atrazine au sein d'un échantillon. Ce composé chimique ayant été détecté à concentration élevée avec la méthode QuEChERS et non détecté par méthode PLE, une contamination de l'échantillon de pollen traité par méthode QuEChERS est probable.

Enfin, on peut également s'interroger sur les molécules qui n'ont jamais été détectées et un manque de sensibilité dans le dosage du fenhexamide, de la perméthrine et de la propargite peut être incriminé. En effet, comme déjà abordé précédemment, les limites analytiques établies pour ces molécules étaient singulièrement élevées.

5. Risques sanitaires et environnementaux

5.1. Pour les pollinisateurs

Une étude a permis d'estimer les quantités de pollen transportées par les butineuses. Les auteurs estiment ces quantités à $50 \mu\text{g} \pm 2 \mu\text{g}$ par abeille (Choudhary et Sharma, 2007). De plus, la consommation en pollen des abeilles et des larves s'élève à 10 mg/j et 2 mg/j, respectivement (ANSES, 2013).

Ces informations sont très utiles car elles permettent d'évaluer le risque lié à l'exposition des abeilles domestiques, par contact ou par ingestion, aux pesticides en fonction des concentrations mesurées dans le pollen.

Les doses retrouvées dans le pollen récolté à la ruche permettent rarement d'expliquer les effets létaux (Dively et Kamel, 2012). Pourtant, le pollen étant consommé par les membres de la ruche, des doses de produits phytosanitaires responsables d'effets sublétaux peuvent à terme mettre en péril la survie de la colonie. Mais les associations entre l'apparition de ces effets et les concentrations de pesticides auxquelles les abeilles sont exposées sont difficiles à établir. De plus, comme le soulignent Mullin *et al.* (2010), les conclusions des études sont parfois contradictoires.

Ainsi, de nombreuses études traitent de l'exposition aux pyréthrinoïdes et/ou aux néonicotinoïdes en relation avec la survenue de troubles sublétaux chez les pollinisateurs (ANSES, 2013). Les effets référencés dans la littérature sont des atteintes morphologiques au niveau des glandes hypopharyngiennes (Smodiš Škerl *et al.*, 2009), une modification du comportement chez les butineuses, des égarements des abeilles par une altération des fonctions cognitives (Decourtye *et al.*, 2004) et olfactives (Decourtye *et al.*, 2005) et une

diminution des défenses immunitaires de l'insecte (Desneux *et al.*, 2007). Ces troubles pourraient être dus à une exposition aux produits phytosanitaires des abeilles adultes (Bonmatin *et al.*, 2003) mais aussi des larves pendant leur développement (Dively et Kamel, 2012) par l'intermédiaire du pollen consommé.

L'usage de l'imidaclopride fut controversé dès la fin des années quatre-vingt-dix et suspecté d'être lié à une baisse des populations d'abeilles (Rossi *et al.*, 2005). L'imidaclopride a été interdit en France en 2004 puis réinscrit sur la liste des principes actifs autorisés en 2008 sous décision européenne malgré les conclusions alarmantes d'une étude nouvellement parue (Halm *et al.*, 2006). Depuis, une étude a réussi à établir le lien existant entre l'exposition aux néonicotinoïdes à des doses sublétales et la désorientation des butineuses engendrée (Henry *et al.*, 2012). Finalement, trois molécules appartenant à cette famille – la clothianidine, l'imidaclopride et le thiaméthoxame – ont été interdites dans l'ensemble de l'UE à compter du 1^{er} décembre 2013.

L'exposition aux produits phytosanitaires peut être également néfaste pour les pollinisateurs lorsqu'elle est multiple. Ainsi, des auteurs ont montré que la toxicité de la cyperméthrine serait potentialisée par un fongicide organophosphoré, le chlorothalonil (Thompson et Wilkins, 2003). De même, les fongicides de la famille des triazoles aggraveraient la toxicité de l'acétamipride et du thiaclopride, deux néonicotinoïdes (Iwasa *et al.*, 2004).

Par ailleurs, les produits phytopharmaceutiques se dégradent dans l'environnement en composés chimiques non recherchés lors des dosages de résidus. Toutefois, l'innocuité de ces produits de dégradation n'est aucunement assurée. En plus des difficultés rencontrées pour le dosage des pyréthriinoïdes par méthode PLE, il s'avère que la cyperméthrine et lambda-cyhalothrine sont des composés chimiques peu persistants. Ainsi, les quantités dosées dans le pollen sont très dépendantes du temps séparant le prélèvement des échantillons du traitement phytosanitaire. Leurs produits de dégradation, non recherchés, seraient pourtant potentiellement néfastes (Chauzat *et al.*, 2006).

Les pesticides sont incriminés dans le syndrome d'effondrement des colonies d'abeilles (CCD ou *colony collapse disorder* en anglais) qui frappe la population des abeilles depuis une quinzaine d'années à travers le monde. Mais les pesticides sont loin d'être les seuls incriminés dans l'élévation de la mortalité des abeilles.

Le genre *Varroa*, acariens se nourrissant de l'hémolymphe des hyménoptères, demeure la première cause de disparition des ruches (ANSES, 2013 ; Rosenkranz *et al.*, 2010). Dans le cadre de la lutte contre ce parasite, les apiculteurs sont amenés à utiliser des acaricides tels que le fluvalinate et le coumaphos entre autres. Or, ces substances garantes de la survie des colonies (van Engelsdorp *et al.*, 2009) ne seraient pas dénuées d'effets délétères pour les abeilles (Gregorc et Bowen, 2000 ; Johnson *et al.*, 2010). En effet, le fluvalinate augmenterait sensiblement la toxicité de la bifenthrine, un composé de la famille des pyréthriinoïdes (Mullin *et al.*, 2010).

Les abeilles domestiques sont aussi la cible d'autres agresseurs, comme des agents viraux (Cox-Foster *et al.*, 2007 ; van Engelsdorp *et al.*, 2009) ou des hyménoptères (*Vespa velutina*) comme le rappellent Mullin *et al.* (2010).

Les pesticides, en plus des effets létaux et sublétaux déjà cités, sont aussi responsables de troubles alimentaires au sein de la ruche.

D'une part, les ouvrières sécrètent à partir du pollen une gelée à l'aide de leurs glandes hypopharyngiennes qui sert ensuite de source d'alimentation aux larves. Par atteinte de ces glandes hypopharyngiennes, les ouvrières sont dans l'incapacité de produire la substance nécessaire au développement du couvain (CARI, 2013).

D'autre part, les produits phytosanitaires utilisés comme fongicides sur les cultures ont eux aussi un effet indirect néfaste sur l'alimentation de la colonie. En effet, comme déjà évoqué, le pollen est stocké dans la ruche, imbibé de sécrétions salivaires par les ouvrières et laissé en fermentation avant d'être consommé sous forme de pain d'abeille. Les résidus de ces fongicides subsistant au sein des pollens de fleurs traitées par ces principes actifs vont freiner le développement de la flore nécessaire à la fermentation. Ainsi, les quantités de pain d'abeille produites sont diminuées et les réserves de la colonie peuvent venir à manquer en hiver (ANSES, 2013).

Enfin, la transformation du motif rural, façonné aux besoins de l'agriculture moderne au cours du siècle dernier, constitue une cause supplémentaire à la disparition des pollinisateurs. On a assisté, notamment, à la suppression des bosquets et des haies, lieux d'habitat naturel des bourdons et aires de protection des abeilles. Les colonies sont dès lors davantage exposées aux prédateurs (ANSES, 2013).

De plus, les monocultures sur de grandes étendues rendent les espèces cultivées plus fragiles face aux agresseurs et impliquent donc une intensification des traitements phytosanitaires.

5.2. Pour les consommateurs de pollen

Le pollen est de plus en plus consommé par l'être humain comme complément alimentaire pour ses propriétés diététiques (Blanc, 2010 ; Fujita *et al.*, 2008). En effet, le pollen constitue une source de protéines, de lipides, de glucides, de minéraux (K, Ca, P, Mg, Fe, Zn, Cu, Mn) et de vitamines (B1, B2, B3, B9 et E) (ANSES, 2013 ; Campos *et al.*, 2008). Par ailleurs le pollen, à qui l'on attribue des propriétés antibactériennes, antifongiques, antiallergiques et antioxydantes, trouve quelques indications en médecine traditionnelle (Blanc, 2010).

Pour cette raison, le pollen est soumis au Règlement CE n° 396/2005 concernant les limites maximales applicables aux résidus de pesticides présents dans ou sur les denrées alimentaires et les aliments pour animaux d'origine végétale et animale (Parlement Européen et Conseil de l'UE, 2005). La liste des limites maximales en résidus (MRL ou *maximum residue limits* en anglais) recommandées par la communauté européenne dans les produits de la ruche destinés à la consommation humaine (miel, gelée royale et pollen) sont consultables librement (EU Pesticides database). À noter que des MRL n'ont pas encore été établies pour tous les résidus de pesticides (Tableau 9). Aussi, lorsqu'aucune MRL n'est précisée dans la base de données, un consensus veut que la valeur de 10 µg/kg soit adoptée (Botitsi *et al.*, 2010).

Si on se réfère à ces MRL, il apparaît que certaines concentrations quantifiées dans les pollens sont supérieures aux MRL recommandées (Tableau 9). Effectivement, parmi les pollens analysés, les échantillons 2 et 5 présentent des concentrations en chlorothalonil et en atrazine-déséthyl supérieures à 10 µg/kg, respectivement. Si les résultats des dosages étaient confirmés et si ces pollens étaient destinés à l'alimentation humaine, alors ils pourraient être déclarés impropres à la consommation.

Tableau 9 : Comparaison des plus hautes concentrations détectées et des MRL définies pour les produits de la ruche

(Source : EU Pesticides database)

Molécule	CMD	MRL	Molécule	CMD	MRL
Acétamipride	0,89 **	50	Diméthomorphe	1,29	50
Atrazine-déséthyl	11,62	-	Diphénylamine	?	-
Bupirimate	2,50	-	Flusilazole	3,14	50
Carbaryle	0,88 **	-	Thiaclopride	26,20	200
Chlorothalonil	63,76 *	10	Thiaméthoxame	1,58	10
Cyprodinil	3,16	50	Tolyfluanide	?	-
Deltaméthrine	?	30	Trifloxystrobine	10,15	40

CMD : Concentration maximale détectée ; MRL : *Maximum residue limits* ; * : Plus haute valeur incluse dans la gamme d'étalonnage ; ** : Valeur inférieure à la limite de quantification ; ? : Molécule détectée mais quantification impossible ; - : MRL non établie. Les valeurs sont exprimées en µg/kg.

Les cinq échantillons de pollen proviennent de deux zones géographiques distinctes et ont été constitués sur des périodes de prélèvement différentes (Annexe II). Les trois premiers ont pour origine le nord de la Creuse, au cœur de grandes cultures céréalières, alors que les deux autres proviennent d'un rucher situé au sud-ouest de la Corrèze, en périphérie d'une zone d'arboriculture intense.

Ces profils différents sont responsables des variations spatiales et temporelles déjà évoquées. Ainsi, afin de limiter les concentrations en résidus de pesticides dans le pollen destiné à l'alimentation humaine, des périodes de récolte ont été définies par les autorités.

Enfin, comme pour tous les xénobiotiques, les effets liés à une exposition concomitante à plusieurs pesticides – ou à leurs produits de dégradation – sont méconnus. Les principes actifs n'étant pas suffisants pour expliquer seuls les effets observés lors d'intoxication aiguë chez l'homme, une toxicité des adjuvants utilisés dans les préparations phytosanitaires est également possible (Dulaurent, 2010).

Conclusion générale

La lutte contre les ennemis des cultures est menée depuis cinq mille ans mais a connu un tournant dans les années trente avec le développement de la chimie organique. Dès lors, de nombreux principes actifs, aux propriétés herbicides, fongicides ou insecticides notamment, ont été synthétisés.

Les produits phytosanitaires sont aujourd'hui incontournables : protection des cultures agricoles, entretien des voiries, combat des vecteurs de maladies, ou encore jardinage pour les particuliers. Les ventes annuelles dans le monde s'élèvent ainsi à plus de 28 milliards d'euros et la France, en réalisant 6 % de ce chiffre d'affaires, se place au quatrième rang des pays consommateurs de produits phytopharmaceutiques.

Cependant, suite à l'extension de l'usage des produits phytosanitaires, un impact délétère a été constaté sur les insectes bénéfiques. Une revue de la littérature scientifique a montré qu'un dosage de ces composés chimiques dans le pollen était justifié dans le cadre de l'évaluation des risques liés à l'exposition des pollinisateurs à des doses létales et sublétales de ces produits.

Il est aussi apparu que les études traitant de dosages multi-résidus au sein de cette matrice étaient peu nombreuses. La force d'un tel dosage repose sur la richesse des informations qui peuvent être obtenues à partir d'une seule analyse. Ceci dit, la complexité de la matrice d'étude et la nécessité d'un protocole universel applicable à des composés aux propriétés physico-chimiques parfois opposées, freinent son développement.

La faisabilité d'un dosage multi-résidus de produits phytosanitaires dans le pollen récolté par les abeilles par méthode QuEChERS modifiée et par extraction par solvant à chaud et sous pression a été montrée au travers de cette thèse. La première reprenait pour base le protocole utilisé sur les matrices alimentaires et la seconde était mise en œuvre à l'aide d'un système ASE Dionex®.

Il a été montré que la qualité du dosage était directement liée aux protocoles d'échantillonnage et de traitement des échantillons. En effet, pour éviter tout risque de contamination ou de détérioration des échantillons de pollen, des précautions doivent être prises, notamment en matière de manipulation, de transport et de conservation.

Au regard des études déjà publiées, les limites analytiques développées dans le cadre de cette thèse sont encourageantes. Elles sont effectivement équivalentes voire meilleures que celles établies dans des études précédentes.

Les limites analytiques sont globalement équivalentes entre les deux méthodes d'extraction et par conséquent, aucune ne se démarque réellement de l'autre dans les conditions expérimentales définies. La sensibilité s'avère meilleure tantôt avec l'une ou l'autre méthode, en fonction de l'analyte considéré. On remarque toutefois que le dosage des organochlorés et des organophosphorés est plus sensible lorsque l'extraction par solvant à chaud et sous pression a été réalisée. Au contraire, c'est en aval de la méthode QuEChERS modifiée que le dosage des pyréthriinoïdes et des néonicotinoïdes est le plus sensible.

Une optimisation future des méthodes d'extraction, et notamment la purification de l'extrait, mériterait cependant d'être menée au vu des interférences observées lors de l'analyse par CL/SM-SM et CPG/SM. L'effet matriciel observé lors du dosage serait ainsi potentiellement réduit, et par conséquent la sensibilité du dosage serait améliorée.

Un support d'échange mixte composé d'un mélange de phase ODS et PSA pour la SPE de purification incluse dans méthode QuEChERS augmenterait potentiellement la rétention des composés matriciels tels que les acides gras.

Par ailleurs, le ratio des masses d'échantillon et de phase dispersante peut être optimisé pour le remplissage des cellules d'extraction du système ASE Dionex®. De plus, le recours à une phase apolaire offrirait une meilleure rétention des composés lipidiques matriciels. Par la même occasion, le risque de rétention des analytes polaires, inhérent à l'utilisation du Florisil®, tels que les néonicotinoïdes serait potentiellement réduit.

En outre, une étape de pulvérisation des échantillons avant traitement par PLE aurait sans nul doute amélioré l'homogénéité des échantillons, et de cette façon, une meilleure concordance des résultats auraient pu être appréciée. De plus, cette pulvérisation des grains de pollen aurait contribué à la déstructuration de la matrice et aurait donc facilité l'extraction des analytes. Ainsi, des paramètres de temps de cycle plus courts et de température plus bas auraient pu être tentés pour la méthode PLE et le dosage des molécules fragiles telles que les pyréthriinoïdes aurait peut-être été plus performant.

À noter que des limites analytiques singulièrement élevées ont été remarquées pour quelques molécules. Il est possible que des conditions pré-analytiques particulières soient nécessaires et de ce fait, leur inclusion dans un dosage multi-résidus semble compromise.

Face aux risques liés à l'exposition simultanée à plusieurs produits phytopharmaceutiques, un dosage multi-résidus incluant un large spectre de molécules est à développer. Ce dosage devrait également intégrer les produits de dégradations des pesticides pour lesquels les recherches auraient démontré des effets néfastes.

Par ailleurs, les familles chimiques particulièrement incriminées dans la survenue de troubles sublétaux chez les pollinisateurs pourraient faire l'objet d'un dosage spécifique en complément d'un dosage multi-résidus plus généraliste.

Pour conclure, l'exposition aux produits phytosanitaires n'étant qu'un des facteurs explicatifs de la baisse de population des abeilles, leur dosage doit s'inscrire dans une démarche plus large qui tiendrait compte de l'ensemble des facteurs.

Bibliographie

- [1] Actu-Environnement. « Définition de pesticide ». [en ligne]. Disponible sur : http://www.actu-environnement.com/ae/dictionnaire_environnement/definition/pesticide.php4 (consulté le 18.11.2011)
- [2] Agence de l'eau Seine-Normandie. « Guide pratique des substances toxiques dans les eaux douces et littorales du bassin Seine-Normandie ». France : Editions AESN, 2008. ISBN 978-2-9523536-2-5
- [3] Alder L., Greulich K., Kempe G. *et al.* 2006. « Residue analysis of 500 high priority pesticides: better by GC-MS or LC-MS/MS? ». *Mass Spectrometry Reviews*, 25 (6), p. 838-865.
- [4] Alix A., Barriuso E., Bedos C. *et al.* « Devenir et transfert des pesticides dans l'environnement et impacts biologiques ». In : INRA et Cemagref : Institut national de la recherche agronomique et Centre national du machinisme agricole, du génie rural, des eaux et des forêts. « Pesticides, agriculture et environnement : Réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux ». Paru en décembre 2005, 279 pages.
- [5] Anastassiades M., Lehotay S.J., Stajnbaher D. *et al.* 2003. « Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and « dispersive solid-phase extraction » for the determination of pesticide residues in produce ». *Journal of AOAC International*, 86 (2), p. 412-431.
- [6] ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire – alimentation, environnement, travail. « Santé des abeilles : état des connaissances et perspectives pour la recherche ». Rencontres scientifiques de l'ANSES (le 21.11.2013 ; Maisons-Alfort).
- [7] Barakat A.A., Badawy H.M.A., Salama E. *et al.* 2007. « Simple and rapid method of analysis for determination of pesticide residues in honey using dispersive solid phase extraction and GC determination ». *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 5 (2), p. 97-100.
- [8] BASF Agro. « ADEXAR® ». In : « Catalogue produits phytosanitaires ». Paru le 09.09.2013. [en ligne]. Disponible sur : http://www.agro.basf.fr/agroportal/fr/fr/solutions_produits_et_services/configurateur_de_produit_solution/product_details_43861.html (consulté le 15.12.2013)

- [9] Beekman M. et Ratnieks F.L.W. 2000. « Long-range foraging by the honey-bee, *Apis mellifera* L. ». *Functional Ecology*, 14 (4), p. 490-496.
- [10] Benoît M., Bonicelli B., Guichard L. *et al.* « Connaissance de l'utilisation des pesticides ». In : INRA et Cemagref : Institut national de la recherche agronomique et Centre national du machinisme agricole, du génie rural, des eaux et des forêts. « Pesticides, agriculture et environnement : Réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux ». Paru en décembre 2005, 91 pages.
- [11] Bernal J., Garrido-Bailón E., Del Nozal M.J. *et al.* 2010. « Overview of pesticide residues in stored pollen and their potential effect on bee colony (*Apis mellifera*) losses in Spain ». *Journal of Economic Entomology*, 103 (6), p. 1964-1971.
- [12] Berrada H., Juan C. and Font G. 2010. « Multiresidue analysis of pesticides in pollen by pressurized liquid extraction and gas chromatography mass spectrometry ». *Toxicology Letters*, 196, p. 343.
- [13] Blanc M. 2010. « Propriétés et usage médical des produits de la ruche ». Thèse de Pharmacie. France : Université de Limoges, Faculté de Médecine et de Pharmacie, 144 pages.
- [14] Bodereau-Dubois B. 2011. « Récepteurs nicotiniques neuronaux d'insectes et insecticides : caractérisation de facteurs cellulaires impliqués dans la modulation de l'efficacité des néonicotinoïdes ». Thèse de doctorat. France : Université d'Angers, Faculté des Sciences, 195 pages.
- [15] Bonmatin J.M., Moineau I., Charvet R. *et al.* 2003. « A LC/APCI-MS/MS method for analysis of imidacloprid in soils, in plants, and in pollens ». *Analytical Chemistry*, 75 (9), p. 2027-2033.
- [16] Botitsi H.V., Garbis S.D., Economou A. *et al.* 2011. « Current mass spectrometry strategies for the analysis of pesticides and their metabolites in food and water matrices ». *Mass Spectrometry Reviews*, 30, p. 907-939.
- [17] Bou Khouzam R. 2011. « Développement de la méthodologie analytique et surveillance des contaminants dans le panier de la ménagère au Liban ». Thèse de doctorat. France : Université de Pau et des Pays de l'Adour, Faculté des Sciences, 291 pages.
- [18] Burgot G. et Burgot J.L. 2011. « Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications méthodes chromatographiques, électrophorèses, méthodes spectrales et méthodes thermiques ». Troisième Edition. Paris : Éditions Tec & doc : Lavoisier. ISBN 978-2-7430-0878-4

- [19] Byrne F.J., Visscher P.K., Leimkuehler B. *et al.* 2013. « Determination of exposure levels of honey bees foraging on flowers of mature citrus trees previously treated with imidacloprid ». *Pest Management Science*.
- [20] Campos M.G.R., Bogdanov S., Bicudo de Almeida-Muradian L. *et al.* 2008. « Pollen composition and standardisation of analytical methods ». *Journal of Apicultural Research and Bee World*, 47 (2), p. 156-163.
- [21] Capriotti A.L., Cavaliere C., Giansanti P. *et al.* 2010. « Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction ». *Journal of Chromatography A*, 1217 (16), p. 2521-2532.
- [22] CARI : Centre apicole de recherche et d'information. « Beecome ». 2^{ème} Congrès Européen d'Apiculture (les 9, 10 et 11 novembre 2013 ; Louvain-la-Neuve).
- [23] Carson R. « Silent Spring ». Houghton Mifflin, 1962.
- [24] Casada J.E. « Pest toxicology: the primary mechanisms of pesticide action ». In : « Hayes' handbook of pesticide toxicology ». American Chemical Society, 2009, p. 103-117.
- [25] Chauzat M.P., Faucon J.P., Martel A.C. *et al.* 2006. « A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France ». *Journal of Economic Entomology*, 99 (2), p. 253-262.
- [26] Chauzat M.P., Martel A.C., Cougoule N. *et al.* 2011. « An assessment of honeybee colony matrices, *Apis mellifera* (Hymenoptera : Apidae) to monitor pesticide presence in continental France ». *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30 (1), p. 103-111.
- [27] Choudhary A. et Sharma D.C. 2007. « Dynamics of pesticide residues in nectar and pollen of mustard (*Brassica juncea* (L.) Czern.) grown in Himachal Pradesh (India) ». *Environmental Monitoring and Assessment*, 144 (1-3), p. 143-150.
- [28] Colas C. 2006. « Développement de méthodes physico-chimiques pour le contrôle de la médication par l'*Harpagophytum* et l'*Eleutherococcus*, principes actifs utilisés en phytothérapie équine ». Thèse de Doctorat. France : Ecole Polytechnique, 312 pages.
- [29] Conseil des Communautés Européennes. « Directive 91/414/CEE du 15 juillet 1991 concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques ». In : « Journal officiel des Communautés européennes n° L 230 ». Paru le 19.08.1991, 32 pages.

- [30] Cottard C. et Pajon N. 2010. « Les pesticides encore appelés produits phytosanitaires ». In : ACCESS. [en ligne]. Disponible sur : <http://acces.inrp.fr/eduterre-usages/nappe/html/Ressources/pesticides/pesticides> (consulté le 30.11.2011)
- [31] Cox-Foster D.L., Conlan S., Holmes E.C. *et al.* 2007. « A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder ». *Science*, 318 (5848), p. 283-287.
- [32] Decourtye A., Armengaud C., Renou M. *et al.* 2004. « Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.) ». *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 78 (2), p.83-92.
- [33] Decourtye A., Devillers J., Genecque E. *et al.* 2005. « Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera* ». *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 48 (2), p. 242-250.
- [34] Denhez F. « Les nouvelles pollutions invisibles : Ces poisons qui nous entourent ». Paris : Editions Delachaux et Niestlé, 2011, 288 pages. ISBN 978-2-6030-1808-8
- [35] Desneux N., Decourtye A. et Delpuech J.M. 2007. « The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods ». *Annual Review of Entomology*, 52 (1), p. 81-106.
- [36] DGAL : Direction générale de l'alimentation. « Bilan 2011 des plans de surveillance et de contrôle ». Paru en septembre 2012, 86 pages. [en ligne]. Disponible sur : http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/BILAN_TT_PUBLIC_PSPC_2011-V2_cle8515b3.pdf (Consulté le 09.12.2013)
- [37] Dionex. « ASE 350 Operator's Manual ». 4^e Révision. 1999, 184 pages.
- [38] Dionex. « Les systèmes ASE[®] ». 2010, 8 pages.
- [39] Dively G.P. et Kamel A. 2012. « Insecticide residues in pollen and nectar of a cucurbit crop and their potential exposure to pollinators ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (18), p. 4449-4456.
- [40] Dulaurent S. 2010. « Mise en place d'outils d'aide au traitement des demandes de dosage de pesticides dans les milieux biologiques ». Thèse de doctorat. France : Université de Limoges, Faculté de Médecine et de Pharmacie.
- [41] El Mrabet K. et Charlet P. In : LNE : Laboratoire national de métrologie et d'essais. « Les pesticides ». Paru en janvier 2008, 15 pages. [en ligne]. Disponible sur : <http://www.metrologie-francaise.fr/fr/dossiers/pesticides-tracabilite-mesure.pdf> (consulté le 22.11.2011)

- [42] Encyclopédie Larousse. « Pesticide ». [en ligne]. Disponible sur : <http://www.larousse.fr/encyclopedie/divers/pesticide/78782> (consulté le 19.11.2011)
- [43] EU : European Union. « Pesticides database ». [en ligne]. Disponible sur : http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm (consulté le 12.11.2013)
- [44] Fournier J. « Naissance de la protection chimique des cultures ». In : Oturan Mehmet et Mouchel Jean-Marie. « Pesticides: Impacts environnementaux, gestion et traitements ». Paris : Editions Presses de l'école nationale des Ponts et chaussées, 2007, 18 pages. ISBN 978-2-85978-431-7
- [45] Fujita K., Ito H., Nakamura M. *et al.* 2008. « Determination of chloramphenicol residues in bee pollen by liquid chromatography-tandem mass spectrometry ». *Journal of AOAC International*, 91 (5), p. 1103-1109.
- [46] García-Chao M., Agruñá M.J., Calvete G.F. *et al.* 2010. « Validation of an off line solid phase extraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of systemic insecticide residues in honey and pollen samples collected in apiaries from NW Spain ». *Analytica Chimica Acta*, 672 (1/2), p. 107-113.
- [47] Gatignol C. et Etienne J.C. « Rapport sur pesticides et santé ». In : Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques. Enregistré le 29 avril 2010, 262 pages.
- [48] Gregorc A. et Bowen I.D. 2000. « Histochemical characterization of cell death in honeybee larvae midgut after treatment with *Paenibacillus larvae*, amitraz and oxytetracycline ». *Cell Biology International*, 24 (5), p. 319-324.
- [49] Halm M.P., Rortais A., Arnold G. *et al.* 2006. « New risk assessment approach for systemic insecticides: the case of honey bees and imidacloprid (Gaucho®) ». *Environmental Science & Technology*, 40 (7), p. 2448-2454.
- [50] Henry M., Béguin M., Requier F. *et al.* 2012. « A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees ». *Science*, 336 (6079), p. 348-350.
- [51] Iwasa T., Motoyama N., Ambrose J.T. *et al.* 2004. « Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera* ». *Crop Protection*, 23 (5), p. 371-378.

- [52] Jiménez J.J., Bernal J.L., del Nozal M.J. *et al.* 2007. « Comparative study of sample preparation procedures to determine fipronil in pollen by gas chromatography with mass spectrometric and electron-capture detection ». *Journal of Chromatography A*, 1146 (1), p. 8-16.
- [53] Johnson R.M., Ellis M.D., Mullin C.A. *et al.* 2010. « Pesticides and honey bee toxicity – USA ». *Apidologie*, 41 (3), p. 312-331.
- [54] Kadar A. et Faucon J.P. 2006. « Determination of traces of fipronil and its metabolites in pollen by liquid chromatography with electrospray ionization-tandem mass spectrometry ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (26), p. 9741-9746.
- [55] Kamel A. 2010. « Refined methodology for the determination of neonicotinoid pesticides and their metabolites in honey bees and bee products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (10), p. 5926-5931.
- [56] Kasiotis K.M., Charistos L., Emmanouil N. *et al.* 2011. « Imidacloprid residues on honeybee, honey and pollen from colonies placed on cotton fields ». *Mellifera*, 11 (21/22), p. 32-33.
- [57] Koesukwiwat U., Lehotay S.J., Miao S. *et al.* 2010. « High throughput analysis of 150 pesticides in fruits and vegetables using QuEChERS and low-pressure gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry ». *Journal of Chromatography A*, 1217 (43), p. 6692-6703.
- [58] Lehotay S.J., Mašovská K. and Lightfield A.R. 2005. « Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables ». *Journal of AOAC International*, 88 (2), p. 615-629.
- [59] Leroux P. et Gredt M. 1995. « Étude *in vitro* de la résistance de *Botrytis cinerea* aux fongicides anilinopyrimidines ». In : INRA : Institut national de la recherche agronomique. *Agronomie*, 15, p. 367-370.
- [60] Lesellier E. « Cours : Techniques d'extraction des matrices semi-solides : de la MSPD aux QuEChERS ». France, Université d'Orléans. [en ligne]. Disponible sur : <http://www.univ-orleans.fr/icoa/communications/com2010/lesellier2.pdf> (consulté le 10.12.2013)
- [61] Longnecker M.P., Klebanoff M.A., Zhou H. *et al.* 2001. « Association between maternal serum concentration of the DDT metabolite DDE and preterm and small-for-gestational-age babies at birth ». *Lancet*, 358 (9276), p. 110-114.

- [62] Lorowicka B., Jankowska M. Rutkowska E. *et al.* 2012. « Comparison of extraction techniques by matrix solid-phase dispersion and liquid-liquid for screening 150 pesticides from soil, and determination by gas chromatography ». *Polish Journal of Environmental Studies*, 21 (4), p. 973-992.
- [63] Materialharvest. « Florisil® ». [en ligne]. Disponible sur : http://www.materialharvest.com/welcome/silica_products/florisil_chromatology.html (Consulté le 03.12.2013)
- [64] MN : Macherey-Nagel. « Products for SPE ». [en ligne]. Disponible sur : <http://www.mn-net.com/tabid/4260/default.aspx> (Consulté le 10.12.2013)
- [65] Morzycka B. 2002. « Simple method for the determination of trace levels of pesticides in honeybees using matrix solid-phase dispersion and gas chromatography ». *Journal of Chromatography A*, 982 (2), p. 267-273.
- [66] Mullin C.A., Frazier M., Frazier J.L. *et al.* 2010. « High levels of miticides and agrochemicals in north american apiaries: implications for honey bee health ». *PLoS ONE*, 5 (3), e9754.
- [67] ORP : Observatoire des résidus de pesticides. « Les données ». [en ligne]. Disponible sur : <http://www.observatoire-pesticides.gouv.fr/index.php?pageid=381> (consulté le 15.11.2011)
- [68] ORP : Observatoire des résidus de pesticides. « Les pesticides : Historique ». [en ligne]. Disponible sur : <http://www.observatoire-pesticides.gouv.fr/index.php?pageid=61> (consulté le 15.11.2011)
- [69] ORP : Observatoire des résidus de pesticides. « Les pesticides : Introduction ». [en ligne]. Disponible sur : <http://www.observatoire-pesticides.gouv.fr/index.php?pageid=103> (consulté le 19.11.2011)
- [70] Pareja L., Cesio V., Heinzen H. *et al.* 2011. « Evaluation of various QuEChERS based methods for the analysis of herbicides and other commonly used pesticides in polished rice by LC-MS/MS ». *Talanta*, 83 (5), p. 1613-1622.
- [71] Parlement Européen et Conseil de l'Union Européenne. « Directive 98/8/CE du 16 février 1998 concernant la mise sur le marché des produits biocides ». In : « Journal officiel des Communautés européennes n° L 123 ». Paru le 24.04.1998, 63 pages.

- [72] Parlement Européen et Conseil de l'Union Européenne. « Règlement CE n° 396/2005 du 23 février 2005 concernant les limites maximales applicables aux résidus de pesticides présents dans ou sur les denrées alimentaires et les aliments pour animaux d'origine végétale et animale et modifiant la directive 91/414/CEE du Conseil ». In « Journal officiel de l'Union européenne n° L 70 ». Paru le 16.03.2005, 16 pages.
- [73] Przybylski C. et Segard C. 2009. « Method for routine screening of pesticides and metabolites in meat based baby-food using extraction and gas chromatography-mass spectrometry ». *Journal of Separation Science*, 32 (11), p. 1858-1867.
- [74] Rainaud P.L. 2013. « Évaluation des risques à long terme des herbicides à base de glyphosate sur la santé humaine ». Thèse de Pharmacie. France : Université de Limoges, Faculté de Médecine et de Pharmacie, 183 pages.
- [75] Restek. « Préparation des échantillons ». [en ligne]. Disponible sur : http://www.restek.fr/pdf/Preparation_dechantillon.pdf (Consulté le 08.12.2013)
- [76] Rial-Otero R., Gaspar E.M., Moura I. *et al.* 2007. « Chromatographic-based methods for pesticide determination in honey: an overview ». *Talanta*, 71 (2), p. 503-514.
- [77] Rosenkranz P., Aumeier P. et Ziegelmann B. 2010. « Biology and control of *Varroa destructor* ». *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, p. S96-S119.
- [78] Ross B. et Harvey J. 1981. « A rapid, inexpensive, quantitative procedure for the extraction and analyses of penncap-m (methyl parathion) from honeybees (*Apis mellifera* L.), beeswax, and pollen ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29 (5), p. 1095-1096.
- [79] Rossi S., Sabatini A.G., Cenciarini R. *et al.* 2005. « Use of high-performance liquid chromatography-UV and gas chromatography-mass spectrometry for determination of the imidacloprid content of honeybees, pollen, paper filters, grass, and flowers ». *Chromatographia*, 61 (3-4), p. 189-195.
- [80] Saïssy J.M. et Rüttimann M. « Intoxication par les organophosphorés ». In : Consensus d'actualisation SFAR – Médecine d'urgence, 1999. [en ligne]. Disponible sur : <http://www.urgences-serveur.fr/IMG/pdf/organophosphore.pdf> (consulté le 16.11.2011)
- [81] Sánchez-Brunete C., Miguel E. Albero B. *et al.* 2008. « Determination of fipronil residues in honey and pollen by gas chromatography ». *Spanish Journal of Agricultural Research*, 6 (S), p. 7-14.

- [82] Schoning R. et Schmuck R. 2003. « Analytical determination of imidacloprid and relevant metabolite residues by LC MS/MS ». *Bulletin of Insectology*, 56 (1), p. 41-50.
- [83] Smodiš Škerl M.I., Velikonja Bolta Š., Baša Česnik H. et al. 2009. « Residues of pesticides in honeybee (*Apis mellifera carnica*) bee bread and in pollen loads from treated apple orchards ». *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 83 (3), p. 374-377.
- [84] Somerville D.C. 2006. « Lipid content of honey bee-collected pollen from south-east Australia ». *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 45 (12), p. 1659-1661.
- [85] Tanner C.M., Kamel F., Ross G.W. et al. 2011. « Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease ». *Environmental Health Perspectives*, 119 (6), p. 866-872.
- [86] Testud F. et Grillet J.P. « Produits phytosanitaires : intoxications aiguës et risques professionnels ». Nouvelle Ed*. Paris : Editions ESKA, 2007, 431 pages. ISBN 978-2-7472-1145-1
- [87] Thompson H. et Wilkins S. 2003. « Assessment of the synergy and repellency of pyrethroid/fungicide mixtures ». *Bulletin of Insectology*, 56 (1), p. 131-134.
- [88] UIPP : Union des industries de la protection des plantes. « Archives ». [en ligne]. Disponible sur : <http://www.uipp.org/Services-pro/Chiffres-cles/archives-campagnes-2010-2011> (consulté le 10.02.2012)
- [89] van Engelsdorp D., Evans J.D., Saegerman C. et al. 2009. « Colony collapse disorder: a descriptive study ». *PLoS ONE*, 4 (8), e6481.
- [90] Vazquez-Quintal P.E., Muñoz-Rodríguez D., Medina-Peralta S. et al. 2012. « Extraction of organochlorine pesticides from bee pollen by matrix solid-phase dispersion: recovery evaluation by GC-MS and method validation ». *Chromatographia*, 75 (15-16), p. 923-930.
- [91] Villa S., Vighi M., Finizio A. et al. 2000. « Risk assessment for honeybees from pesticide-exposed pollen ». *Ecotoxicology*, 9 (4), p. 287-297.
- [92] Ware G.W. et Whitacre D.M. « The Pesticide Book ». Sixième Edition. Willoughby, OH : Editions MeisterPro Information Resources, 2004, 488 pages. ISBN 978-1-8928-2911-5
- [93] Waters. « White Paper ». [en ligne]. Disponible sur : <http://www.waters.com/waters/library.htm?cid=10072671&lid=134629858> (Consulté le 09.12.2013)

- [94] Wiest L., Buleté A., Giroud B. *et al.* 2011. « Multi-residue analysis of 80 environmental contaminants in honeys, honeybees and pollens by one extraction procedure followed by liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometric detection ». *Journal of Chromatography A*, 1218 (34), p. 5743-5756.
- [95] Wilkowska A. et Biziuk M. 2011. « Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology ». *Food Chemistry*, 125 (3), p. 803-812.

ANNEXES

Annexe I

Détail des molécules extraites des pollens et analysées par CL/SM-SM

Molécules	Indications	Familles chimiques
Acétamipride	Insecticide	Néonicotinoïdes
Atrazine	Herbicide	Triazines
Atrazine-déséthyl	Produit de dégradation	Triazines
Atrazine-désisopropyl	Produit de dégradation	Triazines
Bupirimate	Fongicide	Pyrimidines
Carbaryle	Insecticide	Carbamates
Clothianidine	Insecticide	Néonicotinoïdes
Cyprodinil	Fongicide	Anilinopyrimidines
Diflufénicanil	Herbicide	Pyridine-carboxamides
Diméthomorphe	Fongicide	Dérivés de l'acide cinnamique
Diphénylamine	Fongicide	Amines
Diuron	Herbicide	Phénylaminés
Fenhexamide	Fongicide	Hydroxyanilides
Fénoxycarbe	Insecticide	Carbamates
Fludioxonil	Fongicide	Phénylpyrroles
Flusilazole	Fongicide	Triazoles
Hexaconazole	Fongicide	Triazoles
Imidaclopride	Insecticide	Néonicotinoïdes
Krésoxym-méthyl	Fongicide	Strobilurines
Pirimicarbe	Insecticide	Carbamates
Propargite	Acaricide	Sulfites d'ester
Pyriméthanile	Fongicide	Anilinopyrimidines
Tébuconazole	Fongicide	Triazoles
Thiaclopride	Insecticide	Néonicotinoïdes
Thiaméthoxame	Insecticide	Néonicotinoïdes
Trifloxystrobine	Fongicide	Strobilurines

Annexe I

Détail des molécules extraites des pollens et analysées par CPG/SM

Molécules	Indications	Familles chimiques
Bifenthrine	Insecticide / Acaricide	Pyréthriinoïdes
Captane	Fongicide	Phtalimides
Chlorothalonil	Fongicide	Organochlorés
Chlorpyriphos-éthyl	Insecticide	Organophosphorés
Cyperméthrine	Insecticide	Pyréthriinoïdes
Deltaméthrine	Insecticide	Pyréthriinoïdes
Endosulfan alpha	Insecticide / Acaricide	Organochlorés
Endosulfan bêta	Insecticide / Acaricide	Organochlorés
Endosulfan sulfate	Produit de dégradation	Organochlorés
Éthoprophos	Insecticide / Nématocide	Organophosphorés
Folpel	Fongicide	Phtalimides
Lambda-cyhalothrine	Insecticide	Pyréthriinoïdes
Lindane (<i>g</i> -HCH)	Insecticide	Organochlorés
Oxadiazon	Herbicide	Oxadiazolones
Parathion-éthyl	Insecticide	Organophosphorés
Parathion-méthyl	Insecticide	Organophosphorés
Perméthrine	Insecticide	Pyréthriinoïdes
Procymidone	Fongicide	Dicarboximides
Tolyfluanide	Fongicide	Sulfamides
Trifluraline	Herbicide	Toluidines
Vinchlozoline	Fongicide	Dicarboximides

Annexe II

Modalités de prélèvement des pollens



Association pour le
Développement de
l'Apiculture en Limousin

PROTOCOLE PRELEVEMENTS DE POLLENS EN LIMOUSIN - 2010

- Pose des trappes à pollens 48h avant le prélèvement.
- 2 à 4 ruches par emplacement, le mélange des pollens provenant des 2 à 4 ruches constitue 1 échantillon.
- Protocole de prélèvement :
 - Contenant : petit pot en verre : 12 petits pots fournis
 - Prélèvement pollens trappes à pot avec une cuillère « propre »
 - Mains avec gants pour éviter toute contamination (pas de travail à main nue)
 - Echantillons à placer au congélateur dans un endroit sur avec étiquetages
 - Etiquetage : bien indiquer la date, la t° mini maxi, le vent dominant
- Echantillons transmis au CHU en juillet 2011 mais prélevé au printemps 2010 (puis stocker au congélateur)
- 5 échantillons transmis :
 - 3 échantillons en provenance de Creuse (commune de St Pierre Le Bost) du même rucher :
 - Récolte pollen les 19 et 20/05/2010
 - Récolte pollen les 27 et 28/05/2010
 - Récolte pollen les 03 et 04/06/2010
 - 2 échantillons en provenance de Corrèze (commune de Chamboulive) du même rucher :
 - Récolte pollen les 21 et 24/05/2010
 - Récolte pollen les 04/06/2010

NB : la numérotation utilisée dans cette thèse pour différencier les échantillons de pollen suit l'ordre de la liste ci-dessus.

Table des matières

Enseignants de la Faculté de Pharmacie.....	2
Remerciements.....	5
Sommaire.....	8
Liste des abréviations.....	9
Introduction générale.....	11
PREMIÈRE PARTIE : GÉNÉRALITÉS.....	13
Entrée en matière.....	14
1. Préambule.....	14
2. Définition du sujet.....	15
Présentation des pesticides.....	19
1. Historique.....	19
2. Différentes classes.....	22
2.1. Herbicides.....	23
2.2. Fongicides.....	24
2.3. Insecticides.....	25
Marché des pesticides.....	28
1. Données disponibles exploitées.....	28
2. En France.....	29
2.1. Données actuelles.....	29
2.2. Données rétrospectives.....	32
3. Au sein de l'Union Européenne.....	34
4. Dans le monde.....	36
Synthèse.....	38
SECONDE PARTIE : EXTRACTION ET DOSAGE DE RÉSIDUS DE PRODUITS PHYTOSANITAIRES DANS LE POLLEN.....	40
État de l'art.....	41
1. Présentation.....	41
2. Echantillonnage.....	42
2.1. Prélèvement dans l'air ambiant.....	43
2.2. Prélèvement sur les fleurs.....	43
2.3. Prélèvement sur les butineuses.....	43
2.4. Prélèvement dans la ruche.....	44

3. Transport et conservation.....	45
4. Modalités de la préparation de l'échantillon.....	45
4.1. Extraction.....	45
4.2. Purification.....	46
4.3. Diversité des protocoles.....	47
5. Extraction mécanique par solvant et purification successives.....	48
5.1. Extraction.....	48
5.2. Purification par extraction liquide-liquide.....	49
5.3. Dessiccation du milieu.....	50
5.4. Purification par extraction en phase solide.....	51
5.5. Purification par chromatographie par filtration sur gel.....	54
5.6. Cryopurification.....	55
6. Extraction et purification successives par méthode QuEChERS.....	55
7. Extraction et purification simultanées par MSPD.....	57
8. Extraction et purification simultanées par PLE.....	59
9. Dosage des analytes.....	61
9.1. Par chromatographie.....	61
9.2. Par bio-essai.....	62
Matériels et méthodes.....	63
1. Présentation.....	63
2. Echantillonnage.....	64
3. Echantillons traités par méthode QuEChERS.....	65
3.1. Extraction et dosage par CL/SM-SM.....	65
3.2. Extraction et dosage par CPG/SM.....	66
4. Echantillons traités par méthode PLE (système ASE Dionex®).....	67
5. Détermination des concentrations.....	69
5.1. Gamme d'étalonnage.....	69
5.2. Étalon interne.....	70
6. Limites analytiques.....	71
Résultats.....	74
1. Limites analytiques obtenues.....	74
2. Dosage des pesticides dans les pollens.....	75
Discussion.....	77
1. Critique de la matrice d'étude.....	77
2. Critique de la méthode.....	79
2.1. Prélèvement et conservation des échantillons.....	79
2.2. Limitation de l'effet matriciel.....	80
2.3. Extraction des pesticides et purification de l'extrait.....	81
3. Critique des limites analytiques.....	83
4. Critique des résultats.....	88
4.1. Validité des résultats.....	88
4.2. Variabilité des résultats obtenus.....	89
5. Risques sanitaires et environnementaux.....	91
5.1. Pour les pollinisateurs.....	91
5.2. Pour les consommateurs de pollen.....	94

Conclusion générale.....	98
Bibliographie.....	101
ANNEXES	111
Annexe I Détail des molécules extraites des pollens.....	112
Annexe II Modalités de prélèvement des pollens.....	114
Index des illustrations.....	119
Index des tableaux.....	120
Serment de Galien.....	121

Index des illustrations

Illustration 1 :	Présentation des différentes classes.....	18
Illustration 2 :	Répartition du marché français en 2009 par classe en millions d'euros.....	31
Illustration 3 :	Quantités de substances actives vendues en tonnes, en France de 1990 à 2010.....	33
Illustration 4 :	Chiffres d'affaires en millions d'euros en France de 2003 à 2010.....	34
Illustration 5 :	Chiffres d'affaires en 2010 en millions de dollars dans monde.....	36
Illustration 6 :	Chiffres d'affaires mondiaux par classe en 2010 en millions de dollars.....	37
Illustration 7 :	Trappe à pollen d'entrée, avec peigne et panier.....	44
Illustration 8 :	Principe d'une méthode SPE.....	51
Illustration 9 :	Principe de la méthode QuEChERS.....	56
Illustration 10 :	Principe d'une méthode MSPD.....	57
Illustration 11 :	Système ASE 350 Dionex®.....	59
Illustration 12 :	Principe d'une méthode PLE.....	60
Illustration 13 :	Comparaison de deux méthodes d'extraction.....	63
Illustration 14 :	Schéma d'une cellule du système ASE Dionex®.....	67
Illustration 15 :	Comparaison des limites analytiques et nombre de molécules.....	85

Index des tableaux

Tableau 1 : Principaux produits phytopharmaceutiques, triés par classes et par décennie d'apparition.....	22
Tableau 2 : SAU et investissements phytosanitaires par types de production.....	32
Tableau 3 : Tonnages de principes actif et SAU relatifs des pays de l'UE.....	35
Tableau 4 : Molécules extraites des pollens, classées en fonction de la méthode de dosage.....	64
Tableau 5 : Points de la gamme d'étalonnage.....	69
Tableau 6 : Limites analytiques (en µg/kg) en CL/SM-SM, extraction par méthodes QuEChERS et PLE par système ASE Dionex®.....	72
Tableau 7 : Limites analytiques (en µg/kg) en CPG/SM, extraction par méthodes QuEChERS et PLE par système ASE Dionex®.....	73
Tableau 8 : Résultats (en µg/kg) supérieurs aux LDD obtenus pour chaque échantillon de pollen, en fonction de la méthode d'extraction.....	76
Tableau 9 : Comparaison des plus hautes concentrations détectées et des MRL définies pour les produits de la ruche.....	95

Serment de Galien

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

DOSAGE MULTI-RÉSIDUS DE PRODUITS PHYTOSANITAIRES DANS LE POLLEN RÉCOLTÉ PAR LES ABEILLES

Résumé

Un syndrome d'effondrement des colonies d'abeilles (CCD : *colony collapse disorder*) est constaté dans le monde depuis une quinzaine d'années. Plusieurs facteurs, dont l'exposition aux produits phytosanitaires, sont à l'origine de ces pertes. Le pollen, récolté par les butineuses puis amené à la ruche pour y être consommé, constitue une voie d'exposition majeure à ces substances chimiques.

La faisabilité d'un dosage multi-résidus incluant 47 produits phytosanitaires a été étudiée par la mise en œuvre d'une méthode QuEChERS modifiée et d'une extraction par solvant à chaud et sous pression (PLE) sur quelques échantillons de pollen.

Pour une grande majorité des analytes, des limites de détection de 0,25 à 5 µg/kg de pollen ont été atteintes, par CL/SM-SM et CPG/SM, avec les deux méthodes d'extraction.

Toutefois, les interférences observées lors de l'analyse par chromatographie montrent que ces deux méthodes d'extraction, et notamment la purification de l'extrait, méritent d'être optimisées.

Mots-clés

pesticides, pollen, dosage multi-résidus, QuEChERS, extraction à chaud et sous pression.

MULTIRESIDUE ANALYSIS OF PESTICIDES IN BEE POLLEN

Abstract

Colony collapse disorder (CCD), characterized by a rapid loss of the number of honey bees (*Apis mellifera* L.), has been noticed around the world for about fifteen years. Several factors, such as exposition to pesticides, can be related to these losses. Pollen, gathered by honey bees and brought to the hive in order to be consumed, can lead to a substantial exposition to these chemical compounds.

Feasibility of a multiresidue analysis which included 47 pesticides was studied by the implementation of a modified QuEChERS method and a pressurized liquid extraction (PLE) on several pollen samples.

For almost all the residues, limits of detection from 0.25 to 5 µg/kg of pollen were reached, by LC-MS/MS and GC-MS, whatever the extraction method.

However matrix effect has been observed during chromatographic analysis. Therefore extraction methods, especially purification step, deserve to be optimized.

Keywords

pesticides, pollen, multiresidue analysis, QuEChERS, pressurized liquid extraction.
