



HAL
open science

Développement de stratégies analytiques basées sur la LC-MS/MS pour la recherche de traces de pesticides et métabolites dans des matrices apicoles

Claire Jabot

► **To cite this version:**

Claire Jabot. Développement de stratégies analytiques basées sur la LC-MS/MS pour la recherche de traces de pesticides et métabolites dans des matrices apicoles. Chimie analytique. Université de Lyon, 2017. Français. NNT : 2017LYSE1216 . tel-01718115

HAL Id: tel-01718115

<https://theses.hal.science/tel-01718115v1>

Submitted on 27 Feb 2018

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

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



N° d'ordre NNT : 2017LYSE1216

THÈSE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

opérée au sein de

l'Université Claude Bernard Lyon 1

École Doctorale ED 206

École Doctorale de Chimie, Procédés, Environnement

Spécialité de doctorat : Chimie analytique

Soutenance publique prévue le 18 octobre 2017, par :

Claire JABOT

**Développement de stratégies analytiques basées sur la
LC-MS/MS pour la recherche de traces de pesticides
et métabolites dans des matrices apicoles**

Devant le jury composé de :

Mme. Florence PANNIER	Professeur à l'Université de Pau	Rapporteur
M. Maurice MILLET	Professeur à l'Université de Strasbourg	Rapporteur
M. Luc BELZUNCES	Directeur de Recherche à l'INRA	Examineur
M. Didier LÉONARD	Professeur à l'Université de Lyon 1	Président
Mme. Emmanuelle VULLIET	Chargée de Recherche au CNRS	Directeur de thèse
M. Hervé CASABIANCA	Ingénieur de Recherche au CNRS	Co-Directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	M. le Professeur Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Didier REVEL
Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe CHEVALIER
Vice-président de la Commission Recherche	M. Fabrice VALLÉE
Directrice Générale des Services	Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur G.RODE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. X. PERROT
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme C. FELIX
Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. le Professeur J-C PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y.VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. le Professeur E.PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

Cette thèse a été financée par la Région Rhône-Alpes et a été réalisée avec la collaboration d'un partenaire académique, l'équipe Abeille et Environnement de l'INRA d'Avignon (UMR 406), qui nous a permis de réaliser les expériences *in vitro* et *in vivo* dans le cadre de l'étude du métabolisme de certains pesticides dans l'abeille, et de deux partenaires apicoles, l'ADARA (Association de développement de l'Apiculture en Rhône-Alpes) et la FNOSAD (Fédération Nationale des Organisations Sanitaires Apicoles Départementales) qui nous ont fait bénéficier de leur expertise dans le domaine de l'apiculture et fourni les échantillons d'abeille, de pain d'abeille et de cire.

Rhône-Alpes ^{Région}



Association pour
le Développement de
l'Apiculture Rhône-Alpine



Résumé

Depuis plusieurs années, des mortalités anormalement élevées sont observées chez les abeilles, au niveau mondial. Plusieurs facteurs peuvent être à l'origine de ces phénomènes, dont l'utilisation de pesticides. Parmi ceux-ci, les insecticides de la famille des néonicotinoïdes et des pyréthri-noïdes ainsi que certains fongicides de la famille des carboxamides sont mis en cause. Les travaux présentés dans ce manuscrit sont consacrés au développement de méthodes analytiques pour l'identification, la détection et la quantification de 13 pesticides et leurs métabolites dans les abeilles et les produits de la ruche tels que le pain d'abeille et la cire d'abeille.

Dans un premier temps, une méthode originale par dSPE a été développée pour l'extraction des pesticides ciblés dans la cire d'abeille. Combinée à une méthode d'analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse triple quadripôle (UPLC-MS/MS), elle permet d'atteindre des limites de quantification jamais atteintes auparavant en multi-familles sur cette matrice complexe, comprises entre 1 et 40 ng.g⁻¹.

L'application de cette méthode sur des cires ainsi que l'analyse d'autres matrices apicoles fournis par des apiculteurs (au total 488 échantillons dont 125 abeilles, 87 cires et 276 pains d'abeille) ont montré une large présence de ces pesticides dans les ruchers français. Globalement, la cire d'abeille est la matrice présentant les plus fortes concentrations et le pain d'abeille est la matrice la plus contaminée en termes de nombre de pesticides présents.

Une seconde partie des travaux est dédiée à la détection et à l'identification des métabolites de pesticides générés par des expérimentations *in vitro* et *in vivo*. Pour cela, une stratégie analytique, basée sur la complémentarité entre la spectrométrie de

masse à temps de vol et triple quadripôle, a été mise en place. La première permet l'identification des métabolites par la combinaison de la recherche de métabolites connus et de profils isotopiques spécifiques (Cl, Br, S). La seconde permet leur détection et leur quantification dans des échantillons d'abeille.

Cette double approche a notamment permis d'identifier 9 métabolites de pesticides et 5 marqueurs d'exposition. Des métabolites et marqueurs d'exposition au boscalide (carboxamide), principalement issus de réactions d'hydroxylation, déshalogénéation et substitution, ont été synthétisés. Ces derniers ont ensuite été détectés et quantifiés dans des échantillons d'abeilles issus de ruchers symptomatiques.

Les développements analytiques et résultats permettent, d'une part, de faire un état des lieux de la présence de pesticides jugés préoccupants dans les ruchers français. D'autre part, ils fournissent aux écotoxicologues des données permettant de mieux comprendre les modes d'action des pesticides chez les abeilles.

Mots-clés : chromatographie liquide, spectrométrie de masse, abeille, pesticide, métabolisme

Development of analytical strategies based on LC-MS/MS for the analysis of traces of pesticides and metabolites in apiarian matrices

Abstract

For several years, abnormally high mortalities have been observed in bees worldwide. Several factors may be responsible for these phenomena, including the use of pesticides. Among these, insecticides of the family of neonicotinoids and pyrethroids as well as some fungicides of the carboxamide family are implicated. The work presented is devoted to the development of analytical methods for the identification, detection and quantification of 13 pesticides and their metabolites in bees and hive products such as beebread and beeswax.

Initially, an original dSPE method was developed for the extraction of targeted pesticides in beeswax. Combined with a liquid chromatographic analysis method coupled to triple quadrupole mass spectrometry (UPLC-MS/MS), it allows to reach limits of quantification never reached before in multi-families analysis on this complex matrix, between 1 and 40 ng.g⁻¹.

The application of this method to beeswaxes and the analysis of other beekeeping matrices provided by beekeepers (a total of 488 samples including 125 bees, 87 beeswaxes and 276 honeybees) showed a wide presence of these pesticides in french apiaries. Overall, beeswax is the matrix with the highest concentrations and beebread is the most contaminated matrix in terms of number of pesticides present.

A second part of the work is devoted to the detection and identification of pesticide metabolites generated by *in vitro* and *in vivo* experiments. For this, an analytical strategy, based on the complementarity between time-of-flight and triple-quadrupole mass spectrometry, has been put in place. The first allows the identification of metabolites by combining the search for known metabolites and specific isotopic profiles (Cl, Br, S). The second allows their detection and quantification in bee samples.

This dual approach has identified 9 pesticide metabolites and 5 markers of exposure. Metabolites and markers of exposure to boscalid (carboxamide), mainly derived from hydroxylation, dehalogenation and substitution reactions, have been synthesized. These were then detected and quantified in bee samples from symptomatic apiaries.

These analytical developments and results make it possible, on the one hand, to make an inventory of the presence of pesticides of concern in french apiaries. On the other hand, they provide ecotoxicologists with data to better understand the behavior of pesticides in bees.

Keywords : liquid chromatography, mass spectrometry, bee, pesticide, metabolism

Remerciements

Tout d'abord j'adresse mes remerciements à mes directeurs de thèse : Emmanuelle VULLIET et Hervé CASABIANCA. Merci de m'avoir confié ce sujet passionnant. Merci pour vos conseils tout au long de cette thèse, mais également pour votre soutien dans mes choix professionnels d'après-thèse. Merci également à Gaëlle DANIELE, ma co-encadrante, pour son aide experte sur le sujet apicole.

Merci aux membres du jury d'avoir lu, commenté et critiqué mon travail : Didier LÉONARD, le président, Florence PANNIER et Maurice MILLET, les rapporteurs, et Luc BELZUNCES, l'examineur.

Je tiens également à remercier Jean-Jacques LEBRUN, ancien directeur du Service Central d'Analyse du CNRS qui m'a recruté, ainsi que les directeurs successifs de l'Institut des Sciences Analytiques, Pierre TOULHOAT, Michel LACROIX et Nathalie SCHILDKNECH.

J'adresse mes remerciements à l'ensemble des personnes qui ont contribué à la réalisation de ces travaux : l'équipe de l'INRA d'Avignon pour leur accueil chaleureux (j'aurai toujours un excellent souvenir de cette collaboration fort enrichissante, tant scientifiquement qu'humainement !), et les membres des associations apicoles FNO-SAD et ADARA pour leur précieuse collaboration. Merci à Marion GUYNEMER, très engagée dans la problématique de sauvegarde des abeilles, nos échanges furent très intéressants et constructifs.

Un grand merci à mes collègues du laboratoire qui ont rendu ces trois années fort sympathiques grâce à beaucoup de rigolades, de chants (Cabrel évidemment), mais

aussi de discussions très sérieuses : Mika, Charlène, Agneta, Florent, Aurélie F., Inès, Guy, Loïc, Alexandra, Antoine, Martin (courage !), Marie M., Laure, Audrey, Robert, Alexandre. Un grand merci à tous ceux que j'oublie et auxquels je vais repenser dans pas longtemps... vous me connaissez, ma mémoire me fait défaut...

Je tiens à remercier également les personnes des équipes support qui ont toujours répondu présentes pour nous aider et qui nous ont toujours soutenues : David, Lydie, Agnès, Barbara S, Stéphane, ...

Une spéciale dédicace et un IMMMMMense merci à la BeeTeam (oui je vient de l'inventer...) : Barbara et Maëva (« quelque chose vient de tomber, sur les lames de mon plancher »...)... Merci pour l'aide et le soutien que vous m'avez apporté tout au long de ce projet. « On aura bien RRrrigolé quand même !! »

Un merci tout particulier à Aurélie C. ma collègue de galère et Marie H. ma collègue du bout du couloir, qui ont été à mes côtés à toutes les étapes de cette thèse et dans toutes les épreuves qu'il a fallu surmonter. Merci aussi pour les bons (très bons !) moments que l'on a passé au court de ces trois années, que ce soit au labo ou en dehors, et vivement les prochains !

Merci à Charlotte qui m'a soutenue dans la dernière ligne droite (la plus stressante) ! J'ai beaucoup apprécié le « camping » en 2017 ;) Merci d'y avoir cru, j'ai été très touchée par l'aide que tu m'as apportée et ne t'en remercierai jamais assez.

Merci à mes amies qui habitent un peu loin mais qui sont toujours dans mes pensées, et qui m'ont apporté leur soutien malgré la distance :

Mélanie combien de fois on a râlé... « oh j'en peux pluuuuuuus !!! » (2^{ème} année de Master), pourtant on est toutes les deux parvenues à atteindre nos objectifs, je suis fière de nous !!

Marion, merci de ton aide, de ton soutien, de ton accueil à Parentis-en-Born (oui oui, ça existe, je l'ai vu !), merci d'avoir été là toutes ces années, on en a fait du chemin depuis ! Promis plus jamais de « chien de traîneau » (#levrier #monstrueusexpériencedanslesalpesavecmarion #onavraimentfaillirevercejourla #vousavezuntrucsurletoitdelavoiture #jesuismortejenpeuxplus).

Virginie, mon amie de toujours (si si presque !), que de bons moments passés à tes côtés et que de fous rires... je souhaite que ça dure pour la vie ! Merci d'être toi Vivi.

« Non mais Îmagiiiine... »

Un grand merci à tous mes proches du « Castérot », ma seconde famille, qui ont toujours été présents.

À ma famille, qui m'a soutenue et épaulé malgré la distance. Vos encouragements m'allaient droit au cœur.

À mes parents, pour le soutien indéfectible que vous m'avez apporté dans toutes les étapes de ma vie. J'en aurai fais des choix ! Vous en aurez eu des sueurs froides... Merci d'avoir cru en moi. Je n'aurais pas réussi tout ça sans vous.

« Tu es inquiet ?.... et làààààà ??? »

Une pensée toute particulière pour les abeilles, ces créatures incroyables, fascinantes, qui cachent encore bien des secrets et pour lesquelles j'ai le plus grand respect.

Publications et communications

Publications dans des journaux internationaux de rang A

- **Jabot C**, Fieu M, Giroud B, Buleté A, Casabianca H, Vulliet E, Trace-level determination of pyrethroid, neonicotinoid and carbaxamide pesticides in beeswax using dispersive solid-phase extraction followed by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 95 (2015) 240-257, Impact Factor 1.411
- **Jabot C**, Danièle G, Tchamitchan S, Belzunces LP, Casabianca H, Vulliet E, Detection and quantification of boscalid and its metabolites in honeybees, *Chemosphere* 156 (2016) 245-251, Impact Factor 3.698
- Danièle G, Giroud B, **Jabot C**, Vulliet E, Exposure assessment of honeybees through study of hive matrices: analysis of selected pesticide residues in honeybees, beebread, and beeswax from French beehives by LC-MS/MS, *Environmental Science and Pollution Research*, (2017) 1-9, Impact Factor 2.760

Communications orales

Congrès internationaux :

- **Jabot C**, Buleté A, Giroud B, Wiest L, Vulliet E, Distribution of neonicotinoids and pyrethroids in bees and apiarian products: beebread and beeswax – XXXXIII International Apimondia Congress – septembre/octobre 2013 – Kiev (Ukraine)
- **Jabot C**, Buleté A, Giroud B, Vauchez A, Fieu M, Wiest L, Casabianca H, Vulliet E, Pesticides in bees, beebread and beeswax: levels and distribution – Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) Europe 24^{ème} meeting annuel – mai 2014 – Bâle (Suisse)

Congrès nationaux :

- **Jabot C**, Vulliet E, Vauchez A, Fieu M, Wiest L, Buleté A, Répartition des néonicotinoïdes, pyréthri-noïdes et carboxamides dans les abeilles et deux produits de la ruche: le pain d'abeille et la cire – Journée Scientifique Apicole (JSA) – octobre 2013 – Aix-les-Bains
- **Jabot C**, Vulliet E, Vauchez A, Fieu M, Wiest L, Buleté A, Mise au point d'outils analytiques pour la recherche et la quantification de pesticides et leurs métabolites, dans l'abeille et deux produits de la ruche : la cire et le pain d'abeille – Journées de la recherche apicole (JRA) 3ème journée – février 2014 – Paris
- **Jabot C**, Giroud B, Belzunces L, Vulliet E, Daniele G, Recherche de boscalide et de marqueurs d'exposition au boscalide dans les abeilles – Journée de la Recherche Apicole (JRA) 4ème journée – février 2016 – Paris
- **Jabot C**, Giroud B, Belzunces L, Daniele G, Vulliet E, Etude de la métabolisation d'un fongicide, le boscalide, dans l'abeille : caractérisation des métabolites formés et quantification dans des abeilles issues de colonies symptomatiques – Forum ECO-TOX de Rovaltain – octobre 2016 – Valence
- Daniele G, **Jabot C**, Giroud B, Vauchez A, Fieu M, Wiest L, Buleté A, Vulliet E, Recherche de pesticides néonicotinoïdes, pyréthri-noïdes et du boscalide dans trois matrices apicoles : la cire, l'abeille et le pain d'abeille – Forum ECO-TOX de Rovaltain – octobre 2016 – Valence

Communication par affiche

Congrès internationaux :

- **Jabot C**, Belzunces L, Giroud B, Bulete A, Casabianca H, Vulliet E, Identification of pesticide metabolites on honey bees – Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) Europe 24ème meeting annuel – mai 2014 – Bâle (Suisse)
- **Jabot C**, Daniele G, Casabianca H, Belzunces L, Vulliet E, Identification of pesticide metabolites on honeybees – 38th International Symposium on Environmental Analytical Chemistry (ISEAC) – juin 2014 – Lausanne (Suisse)

Congrès nationaux :

- **Jabot C**, Vulliet E, Vauchez A, Fieu M, Wiest L, Buleté A, Mise au point d'outils analytiques pour la recherche et la quantification de pesticides et leurs métabolites dans l'abeille et deux produits de la ruche: la cire et le pain

d'abeille – Journée de Recherche Apicole (JRA) 2ème journée – février 2014 – Paris

- **Jabot C**, Daniele G, Casabianca H, Belzunces L, Vulliet E, Identification of pesticide metabolites on honeybees by the combination of two complementary spectrometric techniques – Journées Françaises de Spectrométrie de Masse et Analyse Protéomique (SMAP) – juin/juillet 2014 – Lyon
- **Jabot C**, Giroud B, Vauchez A, Fieu M, Wiest L, Buleté A, Vulliet E, Daniele G, Étude de la répartition de néonicotinoïdes, pyréthri-noïdes et du boscalide dans trois matrices apicoles: la cire, l'abeille et le pain d'abeille – Journée de Recherche Apicole (JRA) 3ème journée – février 2015 – Paris
- Daniele G, Giroud B, **Jabot C**, Berlioz-Barbier A, Vulliet E, Développement de méthodes analytiques pour comprendre l'impact des pesticides sur des espèces sentinelles de l'environnement – Groupe Français des Pesticides – mai 2015 – Versailles
- Daniele G, **Jabot C**, Giroud B, Belzunces L, Vulliet E, Recherche de biomarqueurs d'exposition au boscalide dans les abeilles par LC-Q-ToF – Groupe Français des Pesticides – mai 2016 – Bordeaux

Table des matières

Liste des figures	xxiv
Liste des tableaux	xxix
Introduction	1
Chapitre I. Contexte global de l'étude	5
1. Les abeilles : reines de la pollinisation et sentinelles de l'environnement	7
1.1. La pollinisation	7
1.2. Sentinelles de l'environnement.....	8
1.3. Les matrices d'intérêt: pain et cire d'abeille.....	10
1.3.1. Le pain d'abeille.....	10
1.3.2. La cire d'abeille	11
2. Les pesticides: classification, propriétés et occurrence	13
2.1. La classification des pesticides : rappels	13
2.1.1. Classification selon la nature chimique.....	13
2.1.2. Classification selon le rôle fonctionnel.....	14
2.2. Utilisation des pesticides dans le monde et en France.....	14
2.3. Les pesticides étudiés	16
2.3.1. La famille des néonicotinoïdes	16
2.3.2. La famille des pyréthri-noïdes.....	21
2.3.3. Un fongicide de la famille des carboxamides : le boscalide.....	24
3. Toxicité des pesticides vis-à-vis des abeilles	25
3.1. La toxicologie et l'écotoxicologie : rappels et évaluation pour les abeilles.....	25
3.1.1. Généralités : toxicologie et écotoxicologie.....	25

3.1.2.	Évaluation chez les abeilles	28
3.2.	Mode d'action, toxicité et incidence des pesticides sur les abeilles.....	30
3.2.1.	Mode d'action des pesticides et conséquences sur les abeilles.....	30
3.2.2.	Toxicités des pesticides étudiés.....	32
4.	Études sur la présence de pesticides dans les matrices apicoles	34
4.1.	Matrices étudiées	34
4.2.	Type d'analyses effectuées et molécules analysées.....	35
4.3.	Exemple de résultats	35
Chapitre II.	Quantification de traces de pesticides dans les matrices apicoles .	37
1.	Introduction et objectifs de l'étude	39
2.	Extraction et analyse des pesticides dans la cire.....	39
2.1.	Préparation d'échantillon, extraction et purification.....	39
2.1.1.	Préparation de l'échantillon	39
2.1.2.	Extraction	40
2.1.3.	Purification.....	44
2.2.	Analyse : Séparation et détection	46
2.2.1.	Séparation par chromatographie	46
2.2.2.	Détection par spectrométrie de masse	48
2.3.	Performances analytiques et validation de méthodes quantitatives	52
2.3.1.	Critères d'identification des composés : sélectivité et spécificité.....	53
2.3.2.	Précision.....	54
2.3.3.	Justesse	55
2.3.4.	Robustesse	55
2.3.5.	Rendements d'extraction.....	55
2.3.6.	Effets de matrice	56
2.3.7.	Limites de détection et de quantification	56
2.3.8.	Modèle de régression	57
3.	Matériels et méthodes.....	58
3.1.	Étalons et réactifs	58
3.1.1.	Solvants	58
3.1.2.	Étalons	58
3.1.3.	Solutions mères.....	58
3.1.4.	Supports d'extraction et de purification	59
3.2.	Échantillons.....	59
3.3.	Prétraitement des échantillons de cire et de pain d'abeille	60
3.4.	Analyse par UPLC-QqQ.....	61

3.5. Préparation d'échantillon	62
3.5.1. Les abeilles	62
3.5.2. Le pain d'abeille.....	63
3.5.3. La cire d'abeille.....	64
3.6. Séparation par chromatographie en phase liquide (UPLC)	65
3.7. Détection par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)	65
3.8. Évaluation et validation de la méthode	67
3.9. Traitement des données et quantification.....	68
4. Résultats et discussions.....	69
4.1. Extraction de la cire d'abeille	69
4.1.1. Développement et optimisation de l'extraction	69
4.1.2. Évaluation des performances et validation de la méthode	81
4.2. Application à des campagnes d'analyses de pesticides dans les matrices apicoles Françaises : abeilles, cire et pain d'abeille	85
4.2.1. Résultats des analyses et discussion	87
Chapitre III. Identification de métabolites chez les abeilles.....	99
1. Introduction et objectifs de l'étude	101
2. L'étude du métabolisme	101
2.1. Le métabolisme des xénobiotiques	101
2.1.1. Généralités.....	101
2.1.2. Le métabolisme des xénobiotiques chez les abeilles	104
2.2. Approches expérimentales pour l'étude du métabolisme des xénobiotiques	105
2.2.1. Production de métabolites : plusieurs modèles	105
2.2.2. Traitement des données : critères d'identification	108
2.3. Marqueurs d'exposition aux pesticides	110
2.4. Préparation d'échantillons	111
3. Matériels et méthodes.....	112
3.1. Abeilles <i>Apis mellifera</i>	112
3.1.1. Abeilles pour la production des métabolites	112
3.1.2. Échantillons d'abeilles pour la détection et la quantification des métabolites.....	112
3.2. Modèle <i>in vitro</i>	112
3.2.1. Réactifs et solutions.....	112
3.2.1. Protocole d'obtention des extraits <i>in vitro</i>	113
3.3. Modèle <i>in vivo</i>	117
3.3.1. Réactifs et solutions.....	117
3.3.2. Protocole d'obtention des extraits <i>in vivo</i>	120

3.4.	Analyse des extraits par HPLC-HRMS pour l'identification des métabolites.....	121
3.4.1.	Appareillage HPLC-HRMS.....	121
3.4.2.	Détection par spectrométrie de masse à haute résolution	122
3.4.3.	Séparation par chromatographie en phase liquide	124
3.4.4.	Détection par spectrométrie de masse à haute résolution (QqToF)	124
3.4.5.	Traitement des données.....	125
3.5.	Quantification du boscalide et de ses métabolites dans les abeilles	128
3.5.1.	Obtention des étalons analytiques	128
3.5.2.	Préparation d'échantillon.....	129
3.5.3.	Séparation par chromatographie en phase liquide.....	129
3.5.4.	Détection par spectrométrie de masse triple quadripôle (QqQ).....	129
4.	Résultats et discussions.....	131
4.1.	Stratégie d'étude: choix des conditions expérimentales	131
4.1.1.	Pesticides étudiés et métabolites connus	131
4.1.2.	Choix des concentrations.....	134
4.1.3.	Echantillons et contrôles.....	138
4.1.4.	Préparation d'échantillon.....	142
4.1.5.	Conditions chromatographiques.....	146
4.1.6.	Détection et gamme de masse	146
4.1.7.	Protocole de recherche des métabolites	147
4.2.	Modèle <i>in vitro</i> : Recherche des métabolites et résultats.....	150
4.2.1.	Diminution de la concentration de la molécule mère dans les extraits.....	150
4.2.2.	Recherche des métabolites connus	153
4.2.3.	Recherche des métabolites chlorés, bromés et/ou soufrés, non répertoriés	153
4.3.	Modèle <i>in vivo</i> : Recherche des métabolites et résultats	154
4.3.1.	Diminution de la concentration de la molécule mère dans les extraits.....	154
4.3.2.	Recherche des métabolites connus	155
4.3.3.	Recherche des métabolites chlorés, bromés et/ou soufrés, non répertoriés	165
4.3.4.	Tableau récapitulatif des métabolites suspectés.....	168
4.3.5.	Analyses de fragmentation et identification des métabolites.....	170
4.4.	Bilan de l'identification des métabolites de pesticides dans les abeilles (tableau)	184
4.5.	Détection et quantification du boscalide et de ses métabolites dans des échantillons d'abeilles	186
4.6.	Conclusions et perspectives.....	188
	Conclusions générales et perspectives	189
1.	Conclusions générales.....	190

2. Perspectives.....	191
Annexes	209
Références	193

Liste des figures

Figure I-1 Pollinisation d'une fleur grâce à l'intervention d'une abeille, d'après (4)	7
Figure I-2 Les quatre espèces du genre <i>Apis</i>	8
Figure I-3 L'abeille domestique.....	9
Figure I-4 Cadre de ruche contenant du pain d'abeille, d'après (16).....	11
Figure I-5 Face ventrale d'un abdomen d'abeille faisant apparaître les écailles de cire exsudées, d'après (17)	11
Figure I-6 Cadre de ruche faisant apparaître les deux types de cire: la cire d'opercule et la cire de corps, Photo © Claire Jabot.....	12
Figure I-7 Répartition du chiffre d'affaire mondial de pesticides par région du monde en 2010 a) et 2014 b) et par catégorie de produits en 2010 c) et 2014 d), d'après (19,20).....	15
Figure I-8 Structure de la nicotine.....	16
Figure I-9 Structure de l'imidaclopride.....	18
Figure I-10 Structure des principaux métabolites de l'imidaclopride.....	19
Figure I-11 Structure de l'acétamipride.....	19
Figure I-12 Structure du thiaméthoxame	19
Figure I-13 Structure du thiaclopride	20
Figure I-14 Structure de la clothianidine.....	20
Figure I-15 Structure de la pyréthrine et structure commune à la famille des pyréthrinoides	21

Figure I-16 Structure de la deltaméthrine.....	22
Figure I-17 Structure de la cyperméthrine.....	22
Figure I-18 Structure de la lambda-cyhalothrine.....	23
Figure I-19 Structure des quatre stéréoisomères de la cyhalothrine dont ceux correspondant à la lambda-cyhalothrine (en rouge), d'après (47).....	23
Figure I-20 Structure de la bifenthrine.....	24
Figure I-21 Structures de la carboxine et du boscalide.....	24
Figure I-22 Courbe dose-réponse théorique, d'après (62).....	28
Figure I-23 Courbes dose-réponse non monotones, d'après (63).....	29
Figure I-24 Nombre de publications obtenues en résultats suite à la recherche par mots clés relatives aux pesticides dans les matrices apicoles - Recherche effectuée sur ScienceDirect.com le 23.07.17.....	34
Figure II-1 Répartition des volumes de solvant utilisés pour l'extraction de pesticides dans la cire, d'après la littérature.....	42
Figure II-2 Détermination du rapport Volume de solvant/Quantité de cire (V/Q) pour chaque étude citée (mL.g ⁻¹).....	43
Figure II-3 Ionisation ESI - Théorie (d'après (121)).....	50
Figure II-4 Schéma d'un analyseur triple quadripôle.....	51
Figure II-5 Illustration du principe de fonctionnement du mode MRM (d'après (122)).....	52
Figure II-6 Récupération du pain d'abeille.....	60
Figure II-7 Éléments constitutifs du prototype de récupération de la cire : la WaxBox60.....	60
Figure II-8 Couplage H-Class UPLC et Xevo TQ-S (Waters®).....	61
Figure II-9 Source ESI Z-spray du Xevo TQ-S (Waters®).....	61
Figure II-10 Éléments constitutifs du détecteur TQ-S (Waters®).....	62
Figure II-11 Protocole de validation de la méthode d'analyse de la cire sur trois jours.....	67
Figure II-14 Influence du temps d'agitation par ultrasons (0 et 40 min) sur les aires obtenues après l'LLE des 12 pesticides dans la cire par le mélange acétate d'éthyle/ACN.....	73
Figure II-15 Rendements d'extraction (%) des 13 pesticides dans la cire obtenus par SPE avec une cartouche EXtrelut®.....	74
Figure II-16 Extraction par cartouche EXtrelut® - Influence du solvant d'extraction sur les aires des 13 pesticides.....	74
Figure II-17 Extraction par cartouche EXtrelut® - Influence d'une étape de purification sur les aires des 13 pesticides.....	75
Figure II-18 Extraction dSPE à base de terre de diatomée: influence du broyage sur (a) les rendements et (b) les effets de matrice.....	77

Figure II-19 Extraction dSPE : influence du volume de solvant d'extraction et de la présence d'acide formique sur les (a) rendements d'extraction et (b) effets de matrice	78
Figure II-20 Extraction dSPE : influence de la présence de DMSO au cours de l'évaporation sur les (a) rendements et (b) effets de matrice	80
Figure II-21 Répartition des résultats de l'analyse des échantillons d'abeilles en fonction des pesticides et des concentrations	87
Figure II-22 Répartition des résultats de l'analyse des échantillons de pain d'abeille en fonction des pesticides et des concentrations	89
Figure -II-23 Répartition des résultats de l'analyse des échantillons de cire en fonction des pesticides et des concentrations	90
Figure II-24 Répartition des concentrations en pesticide par matrice	92
Figure II-25 Répartition géographique des pourcentages de contamination des matrices apicoles françaises.....	93
Figure II-26 Répartition des concentrations en pesticides retrouvés dans les échantillons apicoles français en fonction des régions	94
Figure III-1 Structure de l'iso tripeptide glutathion	103
Figure III-2 Les enzymes des deux phases du métabolisme des xénobiotiques, modifiée de (138).....	104
Figure III-3 Obtention des différentes fractions cellulaires par centrifugation différentielle (modifié de (143)).....	106
Figure III-4 Niveaux de confiance pour l'identification des petites molécules par HR-MS, d'après (146).....	109
Figure III-5 Prélèvement et endormissement des abeilles	113
Figure III-6 Récupération des abdomens d'abeilles.....	115
Figure III-7 Préparation du broyat d'abeilles	115
Figure III-8 Centrifugation du broyat d'abeille en vue de l'obtention des différentes fractions cellulaires	116
Figure III-9 Protocole de mise en cagette des abeilles en vue de l'étude du métabolisme <i>in vivo</i>	120
Figure III-10 Protocole de pulvérisation pour l'étude du métabolisme <i>in vivo</i>	121
Figure III-11 Couplage UHPLC-MS utilisé pour les analyses des extraits <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> - Ultimate 3000 (Dionex) et MicrOTOF-Q II (Bruker).....	122
Figure III-12 Géométries d'analyseurs à temps de vol.....	123
Figure III-13 Structures des métabolites synthétisés du boscalide.....	128
Figure III-14 Répartition des logP estimés des métabolites des 5 pesticide étudiés..	133

Figure III-15 Répartition des m/z $[M+H]^+$ des métabolites connus des pesticides étudiés.....	134
Figure III-16 Taux de mortalité des abeilles obtenus pour les substances actives : thiaméthoxame, thiaclopride, deltaméthrine et lambda-cyhalothrine, d'après les travaux de l'équipe Abeilles et Environnement (UMR 406, INRA Avignon)	136
Figure III-17 Taux de mortalité des abeilles obtenus pour deux formulations commerciales : FlagshipPro Syngenta (thiaméthoxame), DecisProtech Bayer (deltaméthrine) – d'après (162)	137
Figure III-18 Cinétiques de dégradation des substances actives dans l'abeille.....	140
Figure III-19 Chromatogramme reconstitué avec les EIC des cinq pesticides étudiés d'un extrait obtenu par le protocole original d'extraction des abeilles (a) dilué par 5, (b) dilué par 5 puis filtré et (c) non dilué et non filtré.....	143
Figure III-20 Différences de coloration des extraits obtenus après extraction d'abeilles et purification par trois phases : PSA/C18 (Q), Z-sep et Z-sep ⁺	145
Figure III-21 Résultats (aires) de l'analyse des 5 pesticides après extraction des abeilles suivie d'une purification par les trois phases testées : PSA/C18, Z-Sep et Z-Sep ⁺	145
Figure III-22 Protocole de recherche des métabolites connus à partir des analyses LC-ToF	148
Figure III-23 Protocole de recherche de métabolites chlorés, bromés et/ou soufrés, non répertoriés, à partir des analyses LC-ToF.....	149
Figure III-24 Structures possibles des potentiels métabolites du boscalide BoscaMet359Px m/z 359,03 Da	156
Figure III-25 EIC de l'adduit $[M+H]^+$ du composé $C_{18}H_{12}Cl_2N_2O_2$, m/z 359,03 Da dans les différents extraits.....	157
Figure III-26 Comparaison des spectres de masse à T0 et T24 des quatre pics chromatographiques (P1 à P4) de m/z 359,03 Da	158
Figure III-27 Structures possibles du potentiel métabolite du boscalide : BoscaMet375 (m/z 375,03 Da).....	159
Figure III-28 a) Trace chromatographique de l'adduit $[M+H]^+$ du composé $C_{18}H_{12}Cl_2N_2O_3$, de l'ion à 375,03 Da dans les différents extraits, b) Comparaison des spectres de masse à T0 et T24 pour m/z 375,03 Da.....	161
Figure III-29 Structure possible du métabolite du thiaclopride de m/z 237,05 Da, d'après (157)	162

Figure III-30 a) Trace chromatographique de l'adduit $[M+H]^+$ du composé $C_{10}H_9ClN_4O$, m/z 237,05 Da, b) Comparaison des spectres de masse du m/z 237,05 Da à T0 et T24.....	163
Figure III-31 Structure du métabolite du thiaclopride de m/z 269,02 Da, d'après (157)	164
Figure III-32 a) Trace chromatographique de l'adduit $[M+H]^+$ du composé $C_{10}H_9ClN_4SO$, m/z 269,02 Da, b) Comparaison des spectres de masse du m/z 269,02 Da à T0 et T24.....	164
Figure III-33 a) Trace chromatographique de l'adduit $[M+H]^+$ du composé de m/z 253,03 Da, b) Comparaison des spectres de masse du m/z 253,03 Da à T0 et T24 .	166
Figure III-34 a) Trace chromatographique de l'adduit $[M+H]^+$ du composé de m/z 438,23 Da, b) Comparaison des spectres de masse du m/z 438,23 Da à T0 et T24 .	167
Figure III-35 Structures possibles des métabolites BoscaMet359P1, P2 et P3	173
Figure III-36 Structures possibles du métabolite BoscaMet359P4.....	173
Figure III-37 Structures possibles du métabolite BoscaMet375	173
Figure III-38 Composé synthétisé DIV1, pouvant correspondre aux métabolites BoscaMet359 P1, P2 ou P3	174
Figure III-39 Structure du métabolite 248 (m/z 248,02 Da, $C_8H_{10}ClN_3O_2S$) du thiaméthoxame détecté dans la solution de pulvérisation.....	182

Liste des tableaux

Tableau I-1 Toxicité aiguë (DL50 contact et orale sur 48h) des pesticides étudiés sur les abeilles (<i>Apis mellifera</i>), d'après (76)	33
Tableau II-1 Gradient appliqué pour l'analyse LC des 13 pesticides	65
Tableau II-2 Temps de rétention (t_R), transitions de quantification (MRM1) et de confirmation (MRM2) et paramètres de sources pour l'identification et la détection des 13 pesticides par UHPLC-MS/MS	66
Tableau II-3 Concentrations de la courbe de calibration (ng/g).....	68
Tableau II-5 Limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) pour les 13 pesticides, dans les trois matrices d'intérêt : abeilles, cire et pain d'abeille	86
Tableau II-6 Comparaison (nombre et concentration en ng.g ⁻¹) des résultats de la contamination des abeilles, cire et pain d'abeille par l'imidaclopride, la clothianidine et le thiaméthoxame, avant et après la restriction de leur usage en 2013.....	96
Tableau III-1 Composition des milieux pour l'obtention des fractions cellulaires.....	114
Tableau III-2 Composition des deux milieux de métabolisation <i>in vitro</i> : microsomal et cytoplasmique	117
Tableau III-4 Gradient appliqué pour l'analyse LC des extraits <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> ..	124
Tableau III-5 Temps de rétention, transitions de quantification (MRM1) et de confirmation (MRM2) et paramètres de source pour le boscalide et les cinq étalons synthétisés, par LC-QqQ.....	130
Tableau III-6 Nombre de métabolites connus répertoriés dans la littérature pour chacun des pesticides étudiés	132

Tableau III-7 Composition des extraits <i>in vitro</i> pour l'expérience de métabolisation	139
Tableau III-8 Composition des échantillons d'abeilles pour l'expérience de métabolisation <i>in vivo</i>	141
Tableau III-9 Domaines de masse réduits du ToF.....	147
Tableau III-10 Variation (%) d'intensité des ions parents des pesticides étudiés, dans les extraits <i>in vitro</i> entre les temps T0 et T6, par LC-QqQ.....	151
Tableau III-11 Diminution (%) d'intensité des ions parents dans les extraits <i>in vivo</i> entre les temps T0 et T24 par LC-ToF.....	155
Tableau III-12 Liste des métabolites connus détectés dans les échantillons <i>in vivo</i> (T24).....	155
Tableau III-13 Rapport m/z et temps de rétention de métabolites potentiels obtenus à l'issu de la recherche de métabolites chlorés, bromés et/ou soufrés, non répertoriés	165
Tableau III-15 Récapitulatif des analyses de fragmentation des métabolites BoscaMet359Px (P1 à P4) et BoscaMet375.....	171
Tableau III-16 Comparaison des fragments générés par les différents métabolites avec ceux générés par le boscalide.....	172
Tableau III-17 Récapitulatif des métabolites et des marqueurs d'exposition du boscalide identifiés chez l'abeille et dans la solution de pulvérisation au cours des expériences <i>in vivo</i>	176
Tableau III-18 Récapitulatif des analyses de fragmentation du thiaclopride et de ces potentiels métabolites de m/z 237,05 Da et 269,02 Da.....	178
Tableau III-19 Comparaison des fragments générés par les deux métabolites (m/z 237,05 Da et 269,02 Da) avec ceux générés par le thiaclopride.....	179
Tableau III-20 Récapitulatif des métabolites m/z 237,05 Da et 269,02 Da du thiaclopride identifiés chez l'abeille au cours des expériences <i>in vivo</i>	179
Tableau III-21 Fragments issus de l'analyse QqToF du thiaméthoxame et de son potentiel métabolite 253.....	181
Tableau III-22 Fragments issus de l'analyse QqToF de la deltaméthrine et de son potentiel métabolite 438.....	183
Tableau III-23 Tableau bilan : identité des métabolites de pesticides chez les abeilles	184
Tableau III-24 Concentrations en boscalide, en métabolite DIV1 et en marqueurs d'exposition DIV2, DIV3, DIV4 et DIV5 dans des échantillons d'abeilles provenant de ruchers symptomatiques.....	186

Introduction

Les exigences grandissantes du secteur alimentaire, l'augmentation de la population et le développement de cultures non-alimentaires (biofuel, matériaux biodégradables, tissus, ...) ont entraîné de profonds changements dans la gestion des systèmes agricoles au cours du siècle dernier. Ces changements se traduisent notamment par le besoin de contrôler les phénomènes pouvant nuire aux récoltes, tels que le développement et la prolifération de certaines maladies ou ravageurs. Ainsi, l'utilisation des pesticides est devenue incontournable afin de garantir les rendements de production et d'optimiser la qualité des produits cultivés.

Cependant leurs potentiels impacts sur l'environnement (pollution de l'air, des sols, des eaux de surface et souterraines, atteinte de la biodiversité de la faune et de la flore, ...) et sur la santé humaine (cancers, troubles de la reproduction, ...) ont généré une forte préoccupation sociétale et un changement de politiques visant une réduction des risques et des usages des pesticides. De nouvelles molécules agissant à de faibles doses à l'hectare ont été commercialisées et permettent de réduire les quantités utilisées. Malheureusement, ces produits n'en sont pas moins toxiques et leurs impacts latéraux ne sont pas clairement établis.

Un des impacts environnementaux lié à l'utilisation de pesticides est la disparition des insectes pollinisateurs responsables de la reproduction de la majorité des plantes à fleurs. Environ 35 % de la production mondiale de nourriture résulte de cultures dépendant directement des pollinisateurs (1).

Parmi ces insectes pollinisateurs, l'abeille joue un rôle prépondérant dans la production agroalimentaire. Cependant, elle est sujette, depuis une vingtaine d'années, à des mortalités importantes qui sont maintenant connues comme étant multifactorielles : facteurs épidémiologiques (parasites, maladies), facteurs génétiques, facteurs environnementaux (climat, cultures) et facteurs chimiques (pesticides) (2).

Les travaux présentés dans ce manuscrit se concentrent sur les facteurs chimiques, et plus particulièrement sur l'analyse de 13 pesticides et métabolites dans l'abeille et deux matrices apicoles, la cire et le pain d'abeille.

Ils font suite à une précédente étude menée au laboratoire (3), qui avait révélé la présence récurrente de certaines familles de pesticides au sein des ruchers français (abeille, pollen, miel) telles que les néonicotinoïdes et les pyréthri-noïdes.

De plus, cette étude avait mis en lumière le besoin d'analyser d'autres matrices apicoles telles que la cire, continuellement réutilisée par les apiculteurs, et le pain d'abeille, qui représente la seule source de nourriture pour les abeilles durant les mois d'hiver. Toutes deux constituent de potentielles sources de contamination des abeilles

par contact et/ou ingestion. Le pain d'abeille est, de surcroît, une matrice pouvant être utilisée comme indicateur de la contamination de l'environnement des ruchers puisqu'il est constitué des pollens récoltés par les butineuses autour de la ruche.

Du fait de la métabolisation des pesticides par l'abeille, l'étude avait également montré la nécessité d'identifier les métabolites majeurs des pesticides ciblés et de les inclure aux méthodes multi-résidus. En effet, la formation de métabolites chez l'abeille, potentiellement plus toxiques que la molécule mère, est encore peu documentée et leur prise en compte pourrait contribuer à l'étude des risques liés à l'utilisation des substances actives.

Dans ce contexte, ces travaux de thèse ont donc pour objectifs :

- De développer une méthode d'extraction de 13 pesticides et métabolites dans la cire d'abeille
- D'appliquer la méthode développée à des échantillons de cire, issus de divers ruchers français, fournis par des apiculteurs appartenant aux deux organismes apicoles FNOSAD et ADARA
- De compléter l'état des lieux par l'analyse d'abeilles et pain d'abeille provenant des mêmes ruchers
- D'élaborer et mettre en place une stratégie analytique de détection et identification de métabolites basée sur l'utilisation de la spectrométrie de masse à haute résolution
- D'identifier des métabolites, à partir d'expérimentations *in vitro* et *in vivo*, grâce à la collaboration avec l'équipe Abeilles et Environnement de l'INRA d'Avignon
- De quantifier les métabolites ainsi identifiés dans des abeilles issues de ruchers symptomatiques sur le territoire français

Ainsi, ce manuscrit est organisé en trois chapitres comme illustré dans la Figure 0.1.

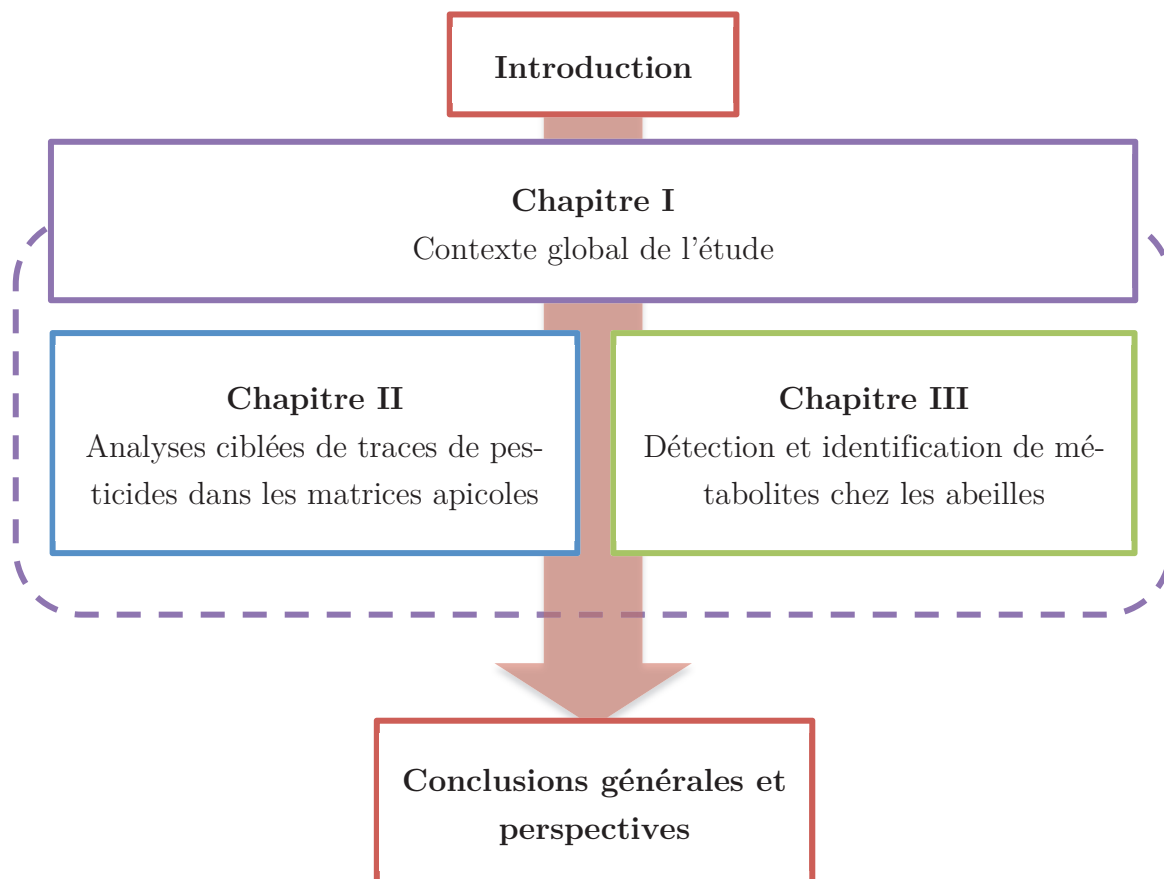


Figure 0.1 Organisation du manuscrit

Le Chapitre I présente les trois matrices d'intérêts (abeille, pain d'abeille et cire), les trois familles de pesticides auxquelles appartiennent les 13 molécules ciblées (néonicotinoïdes, pyréthri-noïdes et carboxamides), et les données toxicologiques disponibles relatives aux abeilles.

Le Chapitre II présente le développement analytique réalisé pour la cire d'abeille, les résultats d'analyses obtenus pour les trois matrices étudiées, et discute ces résultats à l'aide des données fournies par les apiculteurs.

Enfin, le Chapitre III expose la stratégie analytique, la méthodologie et les résultats obtenus pour l'identification de métabolites de certains des pesticides étudiés.

Une conclusion générale permet de dresser un bilan du travail et d'ouvrir sur des perspectives.

Chapitre I. Contexte global de l'étude

1. Les abeilles : reines de la pollinisation et sentinelles de l'environnement

1.1. La pollinisation

La pollinisation, dont le principe est présenté dans la Figure I-1, est un phénomène qui intervient dans la reproduction sexuée des plantes à fleurs. Elle se définit comme le transport des grains de pollen des étamines (organe mâle) vers le pistil (organe femelle).

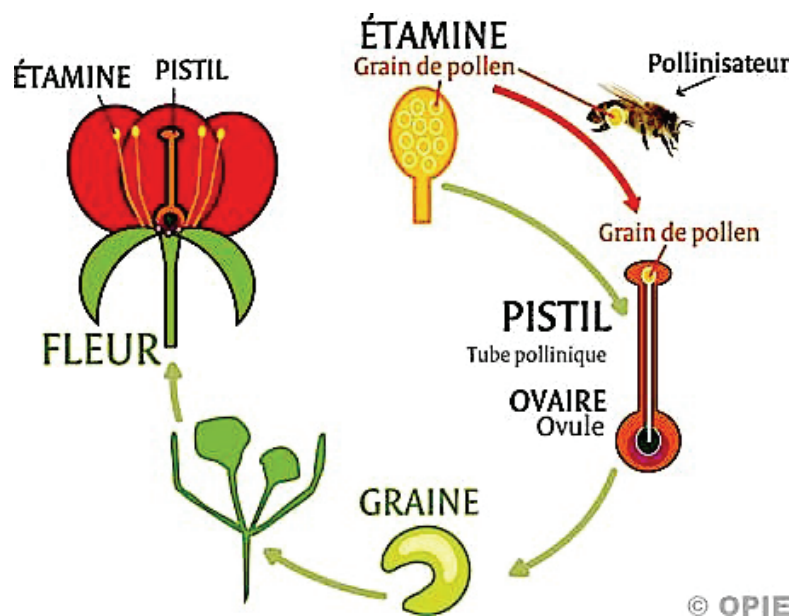


Figure I-1 Pollinisation d'une fleur grâce à l'intervention d'une abeille, d'après (4)

La pollinisation peut s'effectuer grâce à des facteurs physiques (pesanteur, eau, vent) ou à des agents biologiques (insectes, oiseaux, mammifères). Les pollinisateurs les plus importants, à la fois par leur nombre, leur diversité et la variété d'espèces pollinisées, sont les insectes. Parmi eux, ce sont les abeilles qui constituent les pollinisateurs les plus efficaces jouant ainsi un rôle prépondérant dans la biodiversité et le maintien des ressources alimentaires (5). Elles contribuent en effet à la survie et à l'évolution de plus de 80% des espèces de plantes à fleurs, intervenant dans la pollinisation de plus de 200 000 espèces aussi bien sauvages que cultivées (6).

Une fleur correctement pollinisée donnera des fruits et des légumes de meilleure qualité avec par exemple des teneurs en sucre (melon), huile (tournesol, colza) plus élevées

ou des tailles plus importantes (fraises), etc. L'incidence économique directe du service de pollinisation rendu par les abeilles a été évaluée à environ 215 milliards de dollars (US \$) par an, dans le monde (7).

Les apiculteurs et les agriculteurs ont donc des intérêts et des objectifs communs, les uns ayant besoin de fleurs pour faire butiner leurs abeilles afin d'obtenir de bonnes récoltes de miels et faire prospérer leurs colonies, et les autres étant dépendants d'une pollinisation efficace pour obtenir des rendements élevés et des produits de bonne qualité (6).

1.2. Sentinelles de l'environnement

Les abeilles sont des insectes de l'ordre des hyménoptères. Il existe quatre espèces d'abeille appartenant au genre *Apis* (Figure I-2):

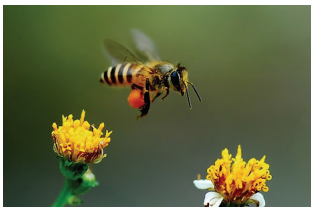
- *Apis dorsata* : abeilles géantes, originaires d'Inde.
- *Apis florea* : abeilles de petite taille originaire d'Asie.
- *Apis cerana* : abeille orientale élevée majoritairement en Asie du Sud-Est.
- *Apis mellifera* : l'abeille domestique, la plus élevée et étudiée à travers le monde.



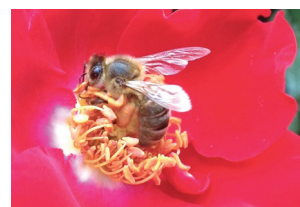
a) *Apis dorsata*
d'après (8)



b) *Apis florea*
d'après (9)



c) *Apis cerana*
d'après (10)



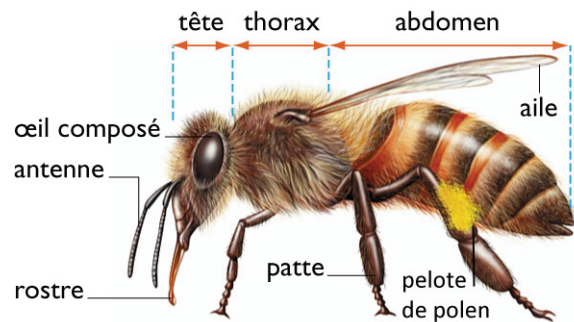
d) *Apis mellifera*
Photo © Claire Jabot

Figure I-2 Les quatre espèces du genre *Apis*

La présente étude s'intéresse uniquement aux abeilles appartenant au dernier groupe : *Apis mellifera* (Figure I-3). En effet, ces dernières étant domestiques, leur surveillance, leur suivi et leur monitoring est plus facile à mettre en place, notamment grâce à la collaboration avec les apiculteurs.



a) L'abeille *Apis mellifera*
Photo © Claire Jabot



b) Anatomie de l'abeille, d'après (11)

Figure I-3 L'abeille domestique

L'abeille vit au sein d'une colonie, dont la taille varie en fonction de la saison d'environ 10 000 à 15 000 individus en période hivernale, et pouvant atteindre 80 000 individus en période de floraison. Son alimentation est principalement basée sur la consommation de nectar et de pollen récoltés sur les fleurs lors du butinage, qui constitue notamment un apport de sucres, protéines, etc. Cette récolte est stockée au sein de la ruche dans les alvéoles, sous forme de miel et de pain d'abeille.

Les colonies d'abeilles sont organisées en trois castes d'individus. Les ouvrières, qui sont les plus nombreuses, se relaient pour occuper divers postes au cours de leur vie : nourrice, bâtisseuse, gardienne, butineuse. La reine, quant à elle, possède un rôle majeur dans le maintien de la colonie puisqu'elle est en charge de la ponte, donc du renouvellement des individus. Pour finir, les mâles (aussi nommés faux-bourçons), sont indispensables à la fécondation des jeunes reines mais n'ont aucun autre rôle au sein de la ruche.

Chacune des trois classes d'individus possède un développement qui lui est propre mais passe par les trois mêmes stades : l'œuf, la larve et la nymphe. Il faudra donc respectivement 16 jours, 21 jours et 24 jours à la reine, à l'ouvrière et au mâle pour atteindre l'âge adulte.

Chaque classe d'individus étant différente, leur espérance de vie l'est également. Ainsi, une reine vivra entre 1 et 4 ans et un mâle une cinquantaine de jours. En re-

vanche, l'ouvrière, en fonction de la saison, vivra de 25 à 30 jours en période de floraison, et de 5 à 6 mois en période hivernale. (12)

Les abeilles butineuses, de part leur fonction, vont être amenées à visiter les fleurs se trouvant jusqu'à 5 km autour de la ruche. Elles sont alors susceptibles d'être en contact avec nombre de polluants présents dans cette zone géographique, dont les pesticides (13,14). Les abeilles permettent donc, après analyse, d'obtenir des informations quant à la qualité de leur environnement. Il est à noter que les abeilles sont également en contact, au sein de la ruche, avec des produits appliqués par les apiculteurs afin d'éviter par exemple les parasites tels que *Varroa*.

Outre leur rôle clé de pollinisateurs, agissant ainsi sur la biodiversité et la qualité des cultures, les abeilles sont donc également des bioindicateurs de l'état de santé de l'écosystème dans lequel elles évoluent : ce sont des « sentinelles de l'environnement ».

Les éléments récoltés par les butineuses (pollen, nectar, sève, etc.) ou directement produits et/ou transformés par les abeilles à partir d'éléments extérieurs à la ruche ou non (pain d'abeille, miel, cire, propolis), peuvent, de la même manière que les abeilles, jouer un rôle d'indicateur de l'état de l'environnement autour de la ruche. Contenant potentiellement toutes les molécules chimiques avec lesquelles l'abeille et/ou les matrices récoltées ont été en contact, l'intérêt de les étudier apparaît clairement.

1.3. Les matrices d'intérêt: pain et cire d'abeille

1.3.1. Le pain d'abeille

Le pain d'abeille (Figure I-4) constitue la base de l'alimentation des abeilles. Il est fabriqué à partir du pollen que les butineuses récoltent sur les fleurs qu'elles visitent. Du miel et de la salive sont ajoutés à ces pelotes de pollen formant une pâte qui est ensuite stockée dans les alvéoles. Les enzymes contenues dans la salive ainsi que les sucs gastriques vont engendrer des processus biochimiques. Le pain d'abeille se forme alors sous l'action de micro-organismes, de l'humidité et de la chaleur (environ 35 °C) qui règne au sein de la ruche. Deux semaines sont généralement nécessaires à la fabrication du pain d'abeille.

Il est composé de protéines, de glucides, de vitamines et de minéraux, qui sont plus facilement assimilables pour les abeilles que ceux contenus dans le pollen. Il présente un taux d'humidité d'environ 14 %. (15)

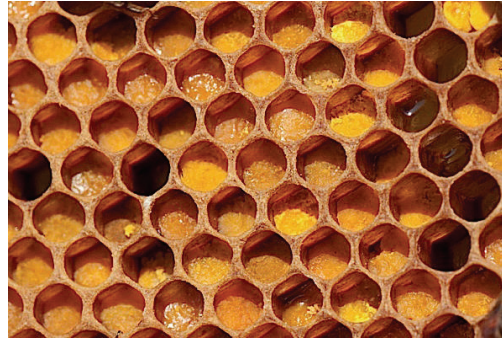


Figure I-4 Cadre de ruche contenant du pain d'abeille, d'après (16)

1.3.2. La cire d'abeille

La cire d'abeille est produite par les glandes cirières de l'abeille, situées sur la face ventrale de son abdomen. Elle s'exsude et se solidifie en écailles (Figure I-5) que l'abeille détache à l'aide de ses pattes postérieures. Elle la malaxe ensuite avec ses mandibules avant de l'utiliser comme matériaux de construction au sein de la ruche.



Figure I-5 Face ventrale d'un abdomen d'abeille faisant apparaître les écailles de cire exsudées, d'après (17)

La cire est de couleur blanche lorsqu'elle est sécrétée puis devient jaune et brune à mesure qu'elle se charge en matières étrangères comme les colorants contenus dans le pollen et la propolis (matière végétale résineuse). Ainsi, plus une cire est foncée, plus elle est ancienne. On distingue la cire d'opercule, qui est blanche et qui sert à opercu-

ler les cellules, et la cire de corps qui est utilisée pour la construction des rayons et dont il est question ici. Ces deux types de cires sont illustrés dans la Figure I-6.



Figure I-6 Cadre de ruche faisant apparaître les deux types de cire: la cire d'opercule et la cire de corps, Photo © Claire Jabot

La cire d'abeille est essentiellement constituée de corps gras dont la composition est d'environ : 71 % d'acides gras (acides palmitique, oléique et linoléique), 14 % d'acides libres et 12 % d'hydrocarbures saturés. Elle contient également 3 % d'eau. Elle est employée dans de nombreux domaines tels que l'artisanat (bougies), la pharmacie (pommades), la cosmétique (rouge à lèvres) et l'alimentation (bonbons).

Contrairement au pollen, au miel et aux abeilles dans le cas de désorientation ou de mortalité, les matrices pain et cire d'abeille sont toutes deux présentes dans la ruche tout au long de l'année, y compris en période hivernale. Ces produits de transformation de l'abeille sont donc susceptibles de contenir les contaminants avec lesquels les abeilles ont été en contact d'où leur intérêt pour évaluer la qualité de l'environnement.

2. Les pesticides: classification, propriétés et occurrence

Les pesticides, ou produits phytosanitaires, sont définis comme des substances dont les propriétés chimiques contribuent à la protection des plantes cultivées et des produits récoltés contre les attaques de champignons, parasites, insectes, acariens, rongeurs, adventices ou « mauvaises herbes ».(18)

Ces produits sont commercialisés sous la forme de formulations pouvant contenir une ou plusieurs substances actives minérales ou organiques, synthétiques ou naturelles, qui agissent de façon globale ou spécifique sur les organismes ou végétaux cibles.

2.1.La classification des pesticides : rappels

Les pesticides regroupent plus de 1000 substances chimiques appartenant à près de 150 familles chimiques différentes. Les pesticides peuvent être classés selon deux modes : en fonction de leur nature chimique ou de leur rôle fonctionnel.

2.1.1.Classification selon la nature chimique

Cette classification prend en compte la nature chimique de la substance active majoritaire. Les pesticides sont alors généralement répartis, entre autres, en cinq groupes principaux : les organochlorés (DDT, lindane, etc.), les organophosphorés (parathion, chlorpyrifos, etc.), les carbamates (carbaryl, propoxur, etc.), les triazines (atrazine, simazine, etc.) et les urées.

Cependant, il existe de nombreuses autres familles chimiques, telles les néonicotinoïdes (exemples : imidaclopride, thiaclopride), les pyréthri-noïdes (exemples : lambda-cyhalothrine, deltaméthrine) et les carboxamides (exemple : boscalide), trois familles dont il est question dans ce manuscrit.

Néanmoins, certains pesticides présentant plusieurs fonctions chimiques peuvent ainsi correspondre à plusieurs groupes. Ce système de classification ne permet donc pas de les classer de manière systématique. De plus, les effets engendrés par les pesticides ne dépendent pas uniquement de la présence d'une fonction mais également de la structure et de la conformation de la molécule.

Il apparaît plus pertinent, dans notre cas, d'utiliser la classification selon le rôle fonctionnel.

2.1.2. Classification selon le rôle fonctionnel

Ce système de classement repose sur la nature de la cible à contrôler. Il existe trois classes principales : les herbicides (contre les adventices), les fongicides (contre les champignons) et les insecticides (contre les insectes). Les autres classes, qui ne seront pas détaillées par la suite, sont par exemple : les acaricides (contre les acariens) ou les rodenticides (contre les rongeurs).

Les herbicides

Ils sont destinés à lutter contre certains végétaux indésirables dans les cultures. En effet, le développement de végétaux au même endroit que les plantes cultivées engendre une concurrence pour l'eau et les nutriments contenus dans le sol. Ceci peut entraîner un ralentissement de la croissance des plantes cultivées et donc une baisse de productivité de la parcelle. Les herbicides peuvent par exemple agir en inhibant la photosynthèse, la croissance cellulaire, ou encore la synthèse des lipides.

Les fongicides

Cette classe de pesticides permet de combattre la prolifération des maladies des plantes provoquées par des champignons ou des bactéries. Ces pesticides peuvent agir par exemple comme inhibiteurs de la respiration (production d'énergie) ou de la division cellulaire (développement) mais aussi comme perturbateur du métabolisme (fonctionnement).

Les insecticides

Ces derniers sont utilisés pour protéger les plantes contre les insectes dans le but de les éliminer ou d'empêcher leur reproduction. Il existe plusieurs types d'insecticides dont les neurotoxiques, agissant sur le système nerveux, les régulateurs de croissance et enfin ceux agissant sur la respiration cellulaire.

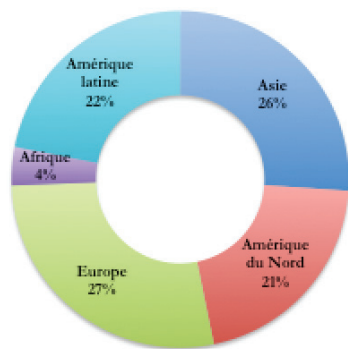
2.2. Utilisation des pesticides dans le monde et en France

En 2010, l'Europe était à la tête du marché mondial des pesticides avec un chiffre d'affaire représentant 27,6 % du chiffre d'affaire mondial (environ 38 milliards de dollars, US \$), devant l'Asie (26,1 %), l'Amérique Latine (21,9 %) et l'Amérique du Nord (20,7 %) (Figure I-7). En 2014, la tendance est à la baisse pour l'Amérique du Nord (17,3 %) et l'Europe (24,5 %), notamment au profit de l'Amérique du Sud (28,5

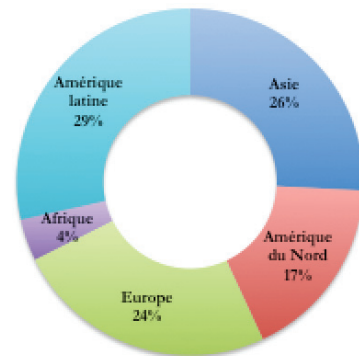
%), pour un chiffre d'affaire mondial en nette augmentation (environ 56 milliards de dollars, US \$) (19,20).

Compte tenu de sa surface agricole qui correspond à la moitié du territoire, la France est, quant à elle, le second pays consommateur de produits phytosanitaires européen, avec plus de 66 000 tonnes de substances actives vendues en 2013 (derrière l'Espagne : plus de 69 000 tonnes) (21).

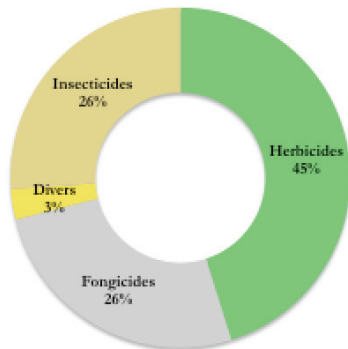
Les herbicides représentent la catégorie de substance la plus consommée au niveau mondial (43,8 %), devant les insecticides (6,1 %) et les fongicides (36,6 %) en 2014.



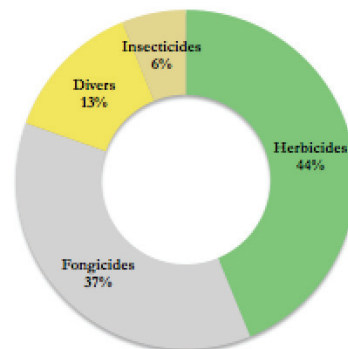
a) Répartition du chiffre d'affaire par région du monde en 2010



b) Répartition du chiffre d'affaire par région du monde en 2014



c) Répartition du chiffre d'affaire mondial en 2010 par catégorie de produits



d) Répartition du chiffre d'affaire mondial en 2014 par catégorie de produits

Figure I-7 Répartition du chiffre d'affaire mondial de pesticides par région du monde en 2010 a) et 2014 b) et par catégorie de produits en 2010 c) et 2014 d), d'après (19,20)

2.3. Les pesticides étudiés

L'étude menée s'est intéressée à des familles de pesticides introduites relativement récemment, agissant à faible dose à l'hectare et fortement utilisées à travers le monde (22–27) et en France (3,28,29).

Au total, 13 pesticides ont été choisis (Annexe 1), dont 12 insecticides : 8 – dont 4 métabolites – appartenant à la famille des néonicotinoïdes, 4 à la famille des pyrèthri-noïdes, et le boscalide, fongicide de la famille des carboxamides.

2.3.1. La famille des néonicotinoïdes

La structure des néonicotinoïdes est dérivée de la structure de la nicotine, présentée dans la Figure I-8.

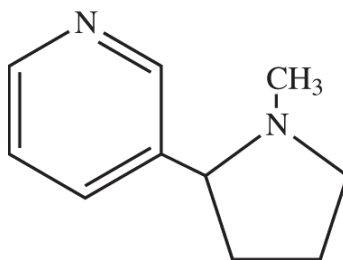


Figure I-8 Structure de la nicotine

Le succès des néonicotinoïdes, découverts en 1985, est en partie dû à deux caractéristiques. D'une part, ils agissent à de faibles doses à l'hectare offrant une meilleure efficacité par rapport aux carbamates et aux organophosphorés (30). En effet, pour être efficaces, il est nécessaire de les appliquer seulement à une dose de 70 à 100 g par hectare contre 2000 g par hectare pour le DDT ou encore 500 g par hectare pour le chlorpyrifos (organophosphoré). D'autre part, ils peuvent être appliqués selon trois modes, ce qui n'est pas le cas des autres pesticides : traitement des parties aériennes des plantes, traitement du sol, et enrobage des semences (mode d'action systémique). Il est estimé que 60 % des applications concernent des traitements de semences ou de sol (31). De plus, ils présentent une moindre persistance dans le sol par rapport à d'autres pesticides comme les insecticides organochlorés, leur temps de demi-vie étant de 2 à 3 mois contre 5,5 ans pour le DDT par exemple (32). Cependant, il est actuellement avéré que certains néonicotinoïdes persistent jusqu'à plusieurs années dans le

sol. C'est le cas par exemple de l'imidaclopride (DT50 jusqu'à 228 jours) et de la clothianidine (DT50¹ jusqu'à 1386 jours soit plus de 3 ans) (33).

Les néonicotinoïdes sont très largement utilisés contre de nombreux ravageurs tels que les insectes piqueurs-suceurs comme les pucerons, les aleurodes, les delphacides, les cicadelles et les thrips (34). Cette famille d'insecticides représente environ un quart du marché mondial des pesticides (35). Parmi les néonicotinoïdes, le thiaméthoxame, l'imidaclopride et la clothianidine, représentent à eux trois environ 85 % des ventes (36). Cette famille d'insecticides présente un mode d'action commun : ils affectent le système nerveux central des insectes, induisant une hyperactivité neuronale puis la mort. Ils ont également un impact sur leur mémoire ou encore sur l'anatomie et la physiologie des reines (30,37).

De plus, les néonicotinoïdes présentent une plus grande sélectivité pour les insectes vis-à-vis des mammifères par rapport aux autres insecticides (excepté les pyréthri-noïdes). Leur facteur de sélectivité mammifère/insecte (DL50² mammifère/DL50 insectes), qui traduit l'efficacité vis-à-vis des insectes, est de 456 et se situent ainsi en deuxième position derrière les pyréthri-noïdes (facteur de sélectivité mammifère/insecte = 4 500) et devant les organochlorés (facteur de sélectivité mammifère/insecte = 91).

Il est à noter que les néonicotinoïdes contenant un groupe nitro (NO₂) sont généralement plus toxiques que ceux contenant un groupe carbonitrile (CN) (38).

Les composés de cette famille d'insecticides sont polaires et présentent de faibles valeurs de log K_{ow} (<2). Ils sont donc particulièrement adaptés pour une application par enrobage de semences. Lorsqu'ils sont utilisés de cette manière, les néonicotinoïdes sont qualifiés de systémiques : ils sont absorbés par les plantes et offrent une protection prolongée et efficace contre les ravageurs, du stade de semence au stade adulte de la plante, en se distribuant dans toutes les parties de la plante (32). Ils sont donc présents dans les feuilles ainsi que dans le pollen et le nectar des fleurs dont la graine a été traitée. Ainsi, pendant la floraison de la plante, les insectes pollinisateurs peuvent être en contact avec l'insecticide.

L'imidaclopride est le premier néonicotinoïde à avoir été commercialisé, en 1991 (36). Depuis, d'autres molécules de la même famille ont été développées. Cependant, ces

¹ DT50 : Dose durée à l'issue de laquelle la concentration initiale dans le sol de la substance active a été réduite de moitié

² DL50 : Dose provoquant la létalité de 50 % d'un échantillon d'individus au bout d'un délai donné

insecticides ayant été mis en cause dans les fortes mortalités d'abeilles, la Commission Européenne a interdit, en 2013 et jusqu'en décembre 2015, l'utilisation de trois néonicotinoïdes (clothianidine, imidaclopride et thiaméthoxame) pour les usages non-professionnels, et a ordonné de restreindre leur utilisation, notamment en ce qui concerne les cultures fruitières, les cultures de fruits à coque ou les cultures de fruits rouges, qui sont particulièrement attractives pour les abeilles (39).

En France, plus récemment, en juin 2016, les députés français ont voté une interdiction des néonicotinoïdes sur l'ensemble des cultures d'ici le 1er septembre 2018, avec cependant des dérogations possibles jusqu'au 1er juillet 2020 (40).

Les néonicotinoïdes étudiés dans ce manuscrit ainsi que leurs principaux usages sont décrits ci-après.

Imidaclopride

L'imidaclopride (Figure I-9), employé sous la formulation GAUCHO® pour l'enrobage des semences et CONFIDOR® pour le traitement des parties aériennes (Bayer), est utilisé dans les champs et en horticulture, notamment comme traitement de semences pour le maïs, le tournesol et le colza. Il est également utilisé pour lutter contre les puces chez les animaux domestiques (32,41).

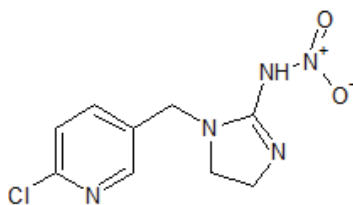
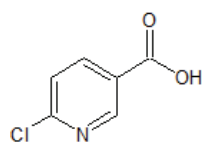


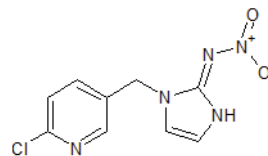
Figure I-9 Structure de l'imidaclopride

Bien que son utilisation ait été limitée en 2013, il reste actuellement autorisé pour une dizaine d'usages, dont la betterave, le blé, les pêches ou encore les rosiers, avec une quinzaine de produits commerciaux (42).

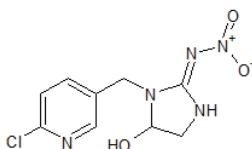
Notre étude s'est également intéressée aux trois principaux métabolites de l'imidaclopride : l'acide-6-chloronicotinique, qui est le métabolite commun à tous les néonicotinoïdes, l'oléfine-imidaclopride et le 5-hydroxy-imidaclopride (Figure I-10). Ces derniers correspondent aux principaux métabolites ayant été détectés chez les végétaux (43) et pouvant être en contact avec les abeilles du fait du caractère systémique de l'imidaclopride.



a) Acide-6-chloronicotinique



b) Oléfine-imidaclopride



c) 5-hydroxy-imidaclopride

Figure I-10 Structure des principaux métabolites de l'imidaclopride

Acétamipride

L'acétamipride (Figure I-11) est apparu sur le marché mondial en 1995 et en France en 2004, sous la formulation SUPRÊME® (Certis), en traitement des parties aériennes des plantes. Il est essentiellement utilisé en culture fruitière contre les pucerons (32,44).

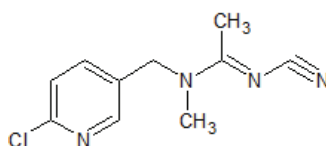


Figure I-11 Structure de l'acétamipride

Thiaméthoxame

Le thiaméthoxame (Figure I-12) est apparu sur le marché mondial en 1998 et en France en 2007, sous la formulation CRUISER® (Syngenta). Il est utilisé sur les cultures fruitières (agrume, pêcher, pommier), maraichères (concombre, laitue, betterave, poivron) et pour les arbres, arbustes, cultures florales et plantes vertes. (42,44)

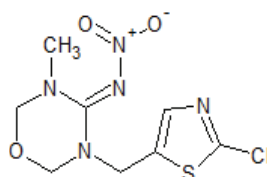


Figure I-12 Structure du thiaméthoxame

Thiaclopride

En 2000, le thiaclopride (Figure I-13) est commercialisé pour une utilisation en traitement du sol sous la formulation EXEMPTOR® et en application foliaire sous la formulation CALYPSO® (Bayer), pour lutter notamment contre les pucerons et les coléoptères. C'est en 2006 qu'il est commercialisé en France (42,44).

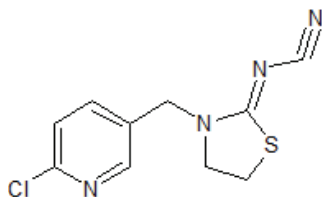


Figure I-13 Structure du thiaclopride

Clothianidine

La clothianidine (Figure I-14), qui est également un métabolite du thiaméthoxame, a été commercialisée en 2001, sur le marché mondial sous la formulation PONCHO® (Bayer), et en 2010 en France sous la formulation DANTOP® (Philagro). Elle est notamment utilisée sur les cultures de maïs, sorgho, pommier, pêcher et pomme de terre (42,44).

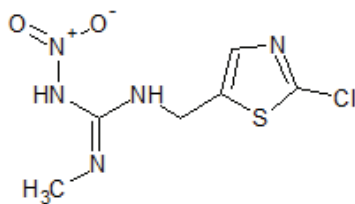


Figure I-14 Structure de la clothianidine

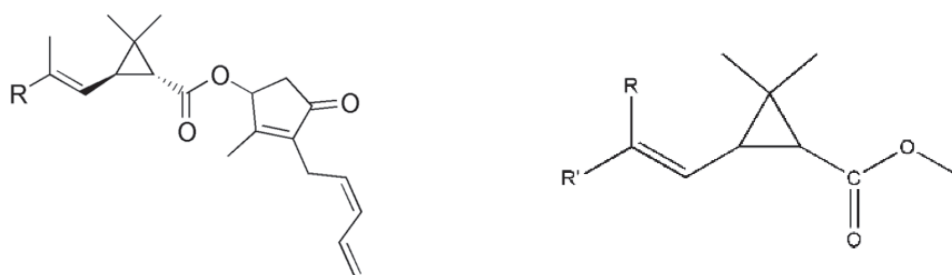
Au total ce sont donc quatre molécules mères (imidaclopride, thiaméthoxame, acétamipride et thiaclopride) et quatre métabolites (acide-6-chloronicotinique, oléfine-imidaclopride et 5-hydroxyimidaclopride et clothianidine), de la famille des néonicotinoïdes, qui ont été étudiés au cours de cette thèse.

2.3.2. La famille des pyréthrinoïdes

Les pyréthrinoïdes sont également des insecticides neurotoxiques. Leur consommation a augmenté à la suite des restrictions instaurées sur d'autres familles de pesticides telles que les organochlorés et les organophosphorés. Ils sont aujourd'hui parmi les plus utilisés tant au niveau professionnel que domestique (45).

Les pyréthrinoïdes présentent les mêmes caractéristiques que les néonicotinoïdes : ils sont actifs à de faibles doses à l'hectare (environ 50 à 200 g par hectare), ils sont peu persistants dans le sol, mais ne possèdent pas la capacité d'être systémiques. Leur sélectivité pour les insectes vis-à-vis des mammifères est la plus élevée des insecticides (facteur de sélectivité mammifères/insectes = 4500) (32).

La famille des pyréthrinoïdes est caractérisée par une structure commune, dérivée de la pyréthrine (Figure I-15) qui est une molécule naturelle issue des fleurs de pyrèthre ou de chrysanthème ($R = \text{CH}_3$ pour la pyréthrine I et $R = \text{CO}_2\text{CH}_3$ pour la pyréthrine II) et mise sur le marché en 1928. Ensuite, des molécules de synthèse, plus stables vis-à-vis de la lumière et qui traversent plus facilement la cuticule des insectes, ont été commercialisées à partir des années 1950 (46).



a) Structure de la pyréthrine

b) Structure commune à la famille des pyréthrinoïdes

Figure I-15 Structure de la pyréthrine et structure commune à la famille des pyréthrinoïdes

Ces composés sont classés en deux groupes en fonction de la présence ou non d'un groupe carbonitrile (-CN). Les pyréthrinoïdes de type I en sont dépourvus contrairement aux pyréthrinoïdes de type II. Ces derniers présentent généralement des toxicités envers les abeilles plus élevées que les pyréthrinoïdes de type I.

Quasiment tous les pyréthrinoïdes (sauf par exemple la deltaméthrine) existent sous forme de mélange d'énantiomères, c'est le cas par exemple de la lambda-cyhalothrine.

Les pyréthri-noïdes sont des molécules très hydrophobes qui, de ce fait, s'accumulent facilement dans les lipides, notamment dans la bicouche phospholipidique membranaire des organismes (46).

Une description des quatre pyréthri-noïdes étudiés dans ce manuscrit ainsi que de leurs principaux usages, est donnée ci-après.

Deltaméthrine

La deltaméthrine, présentée dans la Figure I-16, fait partie des pyréthri-noïdes de type II. Sa première mise sur le marché date de 1977 sous la formulation DECIS® (Bayer) (44). Elle est employée, entre autres, sur les cultures de fruits à coque et de légumes (haricots, pois, légumineuses potagères sèches) (42).

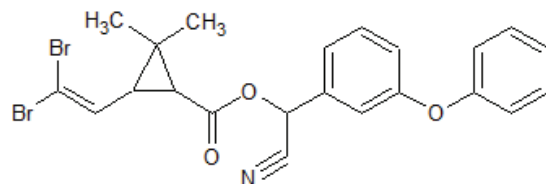


Figure I-16 Structure de la deltaméthrine

Cyperméthrine

La cyperméthrine, mise sur le marché en 1978 sous la formulation RIPCORDER® (BASF) (44), et présentée dans la Figure I-17, fait également partie des pyréthri-noïdes de type II. Elle est principalement employée dans les cultures de légumes (choux, légumineuses potagères sèches, pois) et les arbres (42).

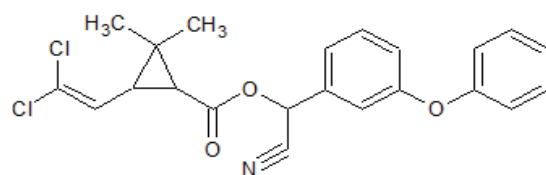


Figure I-17 Structure de la cyperméthrine

Lambda-cyhalothrine

La lambda-cyhalothrine (Figure I-18), mise sur le marché en 1985 sous la formulation KARATE® (Syngenta), fait partie des pyréthri-noïdes de type II (44). Elle est employée sur une large gamme de cultures dont une majorité d'arbres fruitiers (man-

guiers, noyers, oliviers, fruits à coques), de légumes (choux, haricots, pois) et d'arbres (42).

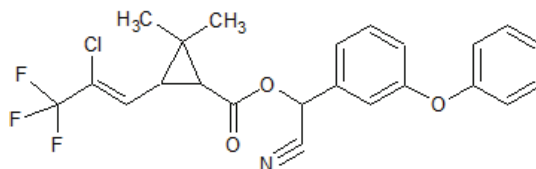


Figure I-18 Structure de la lambda-cyhalothrine

La lambda-cyhalothrine correspond à un mélange de deux énantiomères de la cyhalothrine. La Figure I-19 présente les deux paires d'énantiomères de la cyhalothrine dont celle encadrée en rouge intervient dans la composition de la lambda-cyhalothrine (47).

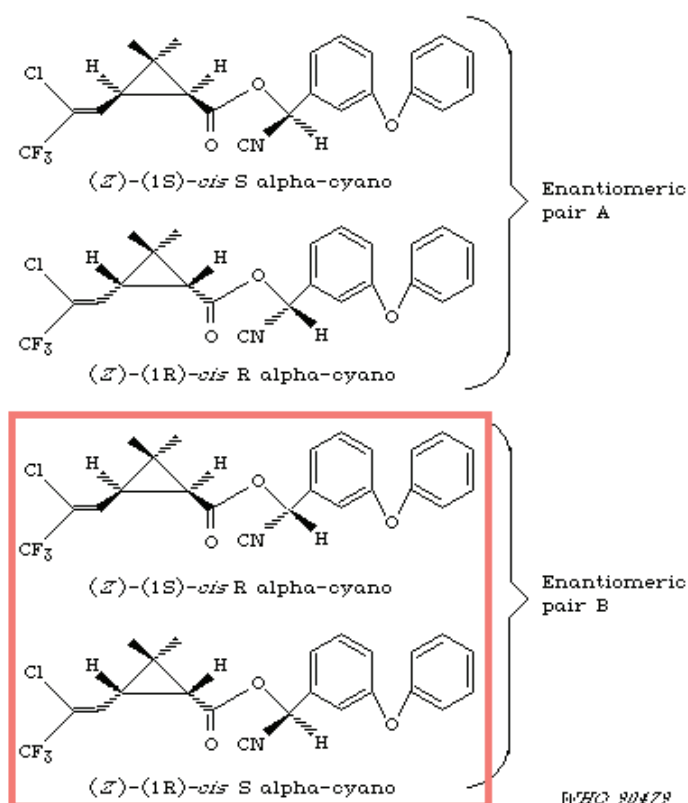


Figure I-19 Structure des quatre stéréoisomères de la cyhalothrine dont ceux correspondant à la lambda-cyhalothrine (en rouge), d'après (47)

Bifenthrine

La bifenthrine (Figure I-20) fait partie des pyréthrinoïdes de type I. Elle a été mise sur le marché en 1985 sous la formulation TASLAR[®] (FMC Agricultural Solutions) (44).

Elle était utilisée sur les cultures maraîchères, la culture des baies ainsi que sur les grandes cultures (betterave, pomme de terre, colza,...) mais a été retirée du marché français en 2010, avec une date limite d'écoulement allant jusqu'en 2011, car considérée comme « préoccupante » lors du Grenelle de l'environnement de 2009 (48).

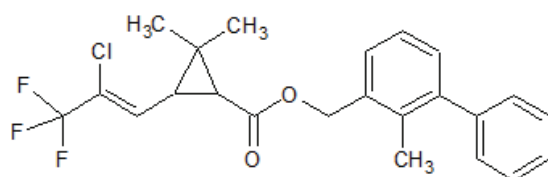
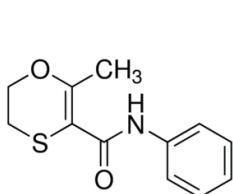


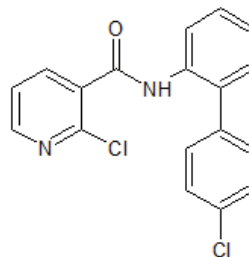
Figure I-20 Structure de la bifenthrine

2.3.3. Un fongicide de la famille des carboxamides : le boscalide

Le boscalide est un fongicide appartenant à la famille des carboxamides. La première molécule de cette famille, la carboxine, fut découverte en 1966 (Figure I-21).



a) Structure de la carboxine



b) Structure du boscalide

Figure I-21 Structures de la carboxine et du boscalide

Les carboxamides peuvent être considérés comme des composés systémiques puisqu'ils sont absorbés par les racines puis transférés dans le xylème (vaisseau). Ils peuvent également pénétrer dans les graines et ainsi détruire les champignons qui s'y seraient infiltrés. Cette propriété permet donc de les employer comme traitement de grains ou même de sol. (49)

Le boscalide a été mis sur le marché en 2005 sous la formulation CANTUS[®] (BASF) (44). Il permet de lutter contre la pourriture grise des fruits et légumes, et est utilisé

sur de très nombreuses cultures comme par exemple le blé, les carottes, les choux, les haricots et les pois (42).

3. Toxicité des pesticides vis-à-vis des abeilles

Il y a environ une vingtaine d'années, de fortes mortalités au sein des ruchers sont apparues de façon globale et inexplicée sur tous les continents, mettant en péril l'équilibre entre l'apiculture et l'agriculture. En 2009, une étude menée aux États-Unis a été publiée suite aux fortes mortalités observées durant les hivers 2006/2007 et 2007/2008 (50), baptisant ce phénomène de « Colony Collapse Disorder (CCD) » ou « syndrome d'effondrement des colonies ». Ce dernier se traduit par la perte rapide des abeilles butineuses. Finalement, plusieurs équipes de recherche à travers le monde se sont intéressées au CCD et aux différentes causes possibles (51–53). Il en est ressorti que celles-ci peuvent être de natures diverses (climatique, virale, bactérienne, génétique, alimentaire, pathogène, chimique). Les abeilles sont souvent exposées à plusieurs de ces facteurs, le contact des abeilles avec les produits chimiques tels que les pesticides étant considéré comme l'un des principaux éléments pouvant affecter la santé des colonies. La mise sur le marché, dans les années 1990, de nouvelles familles de pesticides telles que les néonicotinoïdes a particulièrement été mise en cause dans le phénomène de perte de colonies. Ces composés, généralement plus toxiques que les pesticides utilisés jusqu'alors, sont en effet à l'origine de nouveaux désordres chez les abeilles (troubles neurotoxiques par exemple), qui n'avaient jamais été observés auparavant, impliquant des toxicités aiguës (mort directe) et chroniques (atteinte du système immunitaire, mémoire, apprentissage, etc.) qui affaiblissent les colonies et mettent en péril la pollinisation (7).

3.1. La toxicologie et l'écotoxicologie : rappels et évaluation pour les abeilles

3.1.1. Généralités : toxicologie et écotoxicologie

La toxicologie étudie les effets néfastes d'un xénobiotique (substance étrangère à la vie) sur un organisme vivant. L'écotoxicologie est définie comme une science similaire mais plus globale, qui consiste en « l'étude des modalités de contamination de l'environnement par les agents polluants naturels ou artificiels produits par l'activité hu-

maine ainsi que de leurs mécanismes d'action et effets sur les êtres vivants qui peuplent la biosphère » (54).

Une substance est dite toxique lorsque, « après pénétration dans l'organisme, par quelque voie que ce soit – à une dose relativement élevée (en une fois ou en plusieurs fois très rapprochées) ou par petites doses longtemps répétées –, elle provoque, dans l'immédiat ou après une phase de latence plus ou moins prolongée, de façon passagère ou durable, des troubles d'une ou de plusieurs fonctions de l'organisme pouvant aller jusqu'à leur suppression complète et amener la mort » (55).

La mise en relation d'un xénobiotique et d'un organisme peut soit se révéler bénéfique (exemple : médicament) soit néfaste (exemple : cyanure), bien que cela soit évidemment dépendant de la dose. Les résultats induits par ces substances sur l'organisme sont appelés les effets. Par exemple, chez les abeilles des dysfonctionnements au niveau de la mémoire et de l'orientation sont des effets pouvant être observés suite à une intoxication aux pesticides.

L'augmentation de la dose s'accompagne généralement d'une augmentation de l'intensité ou de la diversité des effets toxiques. Lorsque l'étude porte sur la nature et l'intensité des effets, on parle de relation dose-effet. En revanche, lorsque l'étude porte sur la fréquence de survenue d'un effet au sein d'une population (par exemple la mort), on parle de relation dose-réponse (56). Les effets engendrés peuvent être temporaires lorsqu'ils disparaissent après l'arrêt de l'exposition au toxique, ou bien permanents lorsqu'ils persistent ou s'intensifient après cessation de l'exposition. Pour se défendre et afin de faciliter son excrétion, l'organisme peut agir sur le xénobiotique par des réactions chimiques: réactions de biotransformations (ou de métabolisation), et ce dernier s'en retrouve alors modifié.

Les composés toxiques n'ont pas tous le même degré de toxicité sur les organismes. En effet, la toxicité va dépendre de la structure de ces composés. C'est ce que l'on appelle la relation structure/activité.

D'une manière générale, la toxicité d'une substance dépend de plusieurs paramètres (57) :

- Les caractéristiques de la substance active (structure, conformation, propriétés physico-chimiques, etc.)
- La nature de l'espèce exposée (rat, abeille, Homme, etc.)
- La voie d'exposition (contact, ingestion, etc.)

- La dose d'exposition
- La durée d'exposition
- L'interaction avec une autre molécule, qui peut inhiber (effets antagonistes) ou amplifier (effets synergiques) l'action du composé.

On distingue une exposition aiguë, de courte durée, et une exposition chronique, de longue durée. On parle alors de toxicité aiguë lorsqu'elle est induite par une exposition de courte durée (< 24h ou 48h) et par des doses élevées, et de toxicité chronique lorsqu'elle est induite par une exposition de longue durée et par de faibles doses. La toxicité induite pour une durée intermédiaire est qualifiée de subchronique. La toxicité aiguë se manifeste par des effets réversibles ou irréversibles survenant rapidement après l'exposition. En revanche, les effets engendrés par une exposition de longue durée peuvent survenir quelques mois à quelques années après l'exposition (58,59).

Différentes méthodes permettent d'évaluer ces deux catégories de toxicité :

- Toxicité aiguë :
La toxicité aiguë d'une substance pour un organisme est généralement évaluée en déterminant la quantité de substance pour laquelle la moitié de la population exposée (50 %) meurt après une exposition unique. Cette valeur, généralement déterminée après 24h ou 48h, est appelée la dose létale 50 ou DL50. Lorsque l'administration est réalisée par inhalation, on parle de concentration létale 50 ou CL50, concentration du toxique dans l'air inspiré qui cause la mort de 50% de la population exposée. Plus la DL50 ou CL50 est faible, plus le produit est toxique. (60)
- Toxicité chronique :
La toxicité chronique d'une substance pour un organisme peut être déterminée par deux paramètres : la NOEC³ qui correspond à la plus forte dose pour laquelle aucun effet néfaste n'est observé, et la LOEC⁴ qui correspond à la plus faible dose pour laquelle un effet est observé (61).

Les études de toxicité, notamment aiguë, permettent d'obtenir des courbes dose-réponse telles que celle présentée dans la Figure I-22 (courbe théorique). Cette courbe est généralement monotone et croissante avec la dose (62).

³ NOEC : No Observed Effect Concentration

⁴ LOEC : No Observed Effect Level

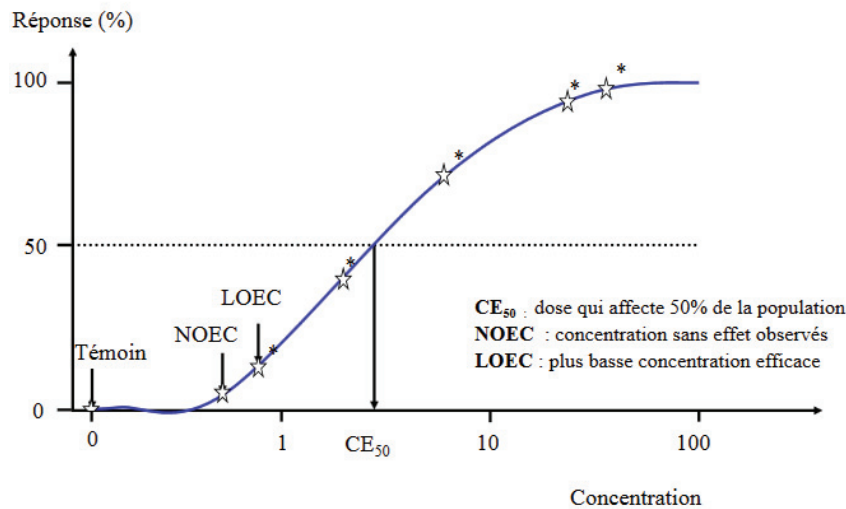


Figure I-22 Courbe dose-réponse théorique, d'après (62)

Cependant, certains composés, comme les perturbateurs endocriniens, peuvent produire des courbes non-monotones telles que celles présentées dans la Figure I-23 (63). Ces dernières montrent qu'en fonction des composés, les courbes dose-réponse peuvent être complètement différentes. Dan Fagin (63) remet notamment en question la logique selon laquelle de faibles doses d'un toxique entraînent des effets moins néfastes que des doses plus importantes. Ceci pose, par conséquent, la question de la validité des grandeurs telles que les limites maximales acceptables pour lesquelles il est dit qu'en dessous de ces seuils, les quantités de toxique sont sans risque.

3.1.2. Évaluation chez les abeilles

L'étude des effets des pesticides sur les abeilles dans des conditions d'exposition réalistes, c'est à dire à de faibles doses et/ou en combinaison avec d'autres xénobiotiques, est d'un intérêt grandissant. Ces études permettent de mieux comprendre l'action et l'influence, à faibles doses, des pesticides.

La diminution de la dose d'exposition à une substance toxique n'est pas obligatoirement synonyme de diminution des effets chez l'abeille. Il a ainsi été montré, dans l'étude de Suchail *et al.* (64), que les toxicités à faibles doses de l'imidaclopride et ses métabolites principaux peuvent être beaucoup plus importantes (jusqu'à 100 000 fois plus) que pour ces mêmes pesticides à fortes doses.

Dans cette étude (64), la dose totale ingérée par les abeilles, à l'issue des huit jours du test de toxicité chronique, est :

- 30 à 3 000 fois plus faible, pour l'oléfine-imidaclopride (métabolite)
- 60 à 6 000 fois plus faible, pour l'imidaclopride (molécule mère)
- 200 à 20 000 fois plus faible pour l'hydroxy-imidaclopride (métabolite)
- 1 000 à 100 000 fois plus faible pour les quatre autres métabolites (4,5-dihydroxy-imidaclopride, desnitro-imidaclopride, acide-6-chloronicotinique et dérivé urée)

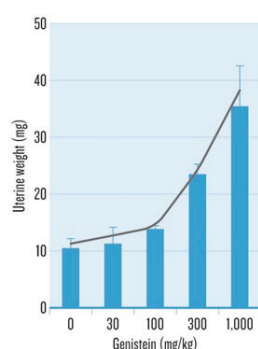
que les doses nécessaires pour produire le même effet lors des tests de toxicité aiguë.

CURIOUS CURVES

Researchers have found that many endocrine-disrupting chemicals do not generate the standard monotonic dose-response curves seen for other types of compound.

MONOTONIC CURVE

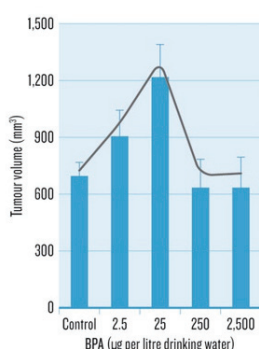
In some cases, dose and response increase together. The plant oestrogen genistein, for instance, causes the mouse uterus to increase in weight.



SOURCE: Ohto, R. et al. *J. Toxicol. Sci.* **37**, 879-889 (2012)

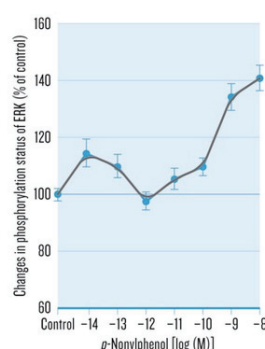
NON-MONOTONIC CURVES

Mice exposed to moderate doses of bisphenol A develop the largest tumours. Moderate and high doses are thought to induce tumour-cell proliferation, but high doses also trigger cell death.



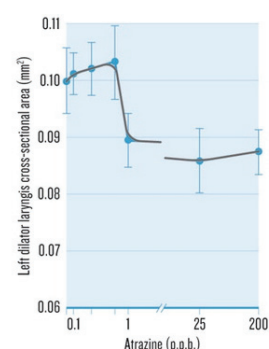
SOURCE: Jenkins, S. et al. *Environ. Health Perspect.* **119**, 1604-1609 (2011)

The oestrogen mimic *p*-nonylphenol stimulates the ERK cell-signalling pathway at low and high doses. Interactions with hormone receptors and other membrane proteins explain the complex shape of the curve.



SOURCE: Bulayeva, N. N. & Watson, C. S. *Environ. Health Perspect.* **112**, 1481-1487 (2004)

Above a certain dose, the herbicide atrazine causes the larynx muscle to shrink in male frogs. But the effect does not increase at higher doses.



SOURCE: Hayes, T. A. et al. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**, 5476-5480 (2002).

Figure I-23 Courbes dose-réponse non monotones, d'après (63)

Les effets peuvent également être différents lorsque les organismes sont, en plus, exposés à d'autres facteurs, que ce soient d'autres pesticides, agents infectieux comme *Nosema ceranae* ou parasites comme le *varroa*, etc (50). Les travaux menés par Aufauvre *et al.* (65) ont mis en évidence un effet de synergie entre un pesticide (fipronil) et l'agent infectieux *Nosema ceranae*. Ainsi, la mortalité engendrée par ces derniers, ensemble, est beaucoup plus importante que celle engendrée par chacun séparément. C'est le cas dans d'autres études, pour des associations de pesticides (imidaclopride + autres pesticides ; néonicotinoïdes + fongicides), qui reportent également des effets de synergie (66,67). Il faut noter que les effets induits peuvent également être antagonistes. C'est le cas dans l'étude d'Aufauvre *et al.* (65) dont les résultats ont montré

que la présence du thiaclopride avec *Nosema ceranae* réduisait l'effet de cet agent infectieux sur les abeilles tout en limitant le développement de ses spores.

Dans la réalité, il est plus probable que les abeilles soient exposées à de faibles doses sur de longues périodes, donc de façon chronique, qu'à de fortes doses en une exposition unique. L'évaluation de la toxicité chronique se fait par l'intermédiaire de tests réalisés en laboratoire, en conditions semi-contrôlées (tunnels) ou en champs sur des périodes plus longues. Le paramètre déterminé est généralement la CL50 ou la DL50. En revanche, cette valeur est beaucoup plus complexe à obtenir pour une colonie entière. C'est pour cette raison que d'autres paramètres (NOEC ou LOEC) sont évalués pour estimer la toxicité chronique lors de tests en conditions semi-contrôlées ou en champs.

Lorsque l'intoxication n'entraîne pas la mort, on parle d'effets sub-létaux. Ils se manifestent de manière plus discrète, par exemple en altérant la physiologie (fonctionnement interne de l'organisme) ou le comportement (dysfonctionnement de l'orientation, apparition de tremblements) des abeilles. Ces dérèglements, généralement observés à des doses équivalentes à environ un dixième de la DL50, peuvent se traduire, par exemple, par une diminution de leur vitalité ou de leur activité au sein de la ruche, pouvant ainsi entraîner un affaiblissement global de la colonie (68).

3.2.Mode d'action, toxicité et incidence des pesticides sur les abeilles

3.2.1.Mode d'action des pesticides et conséquences sur les abeilles

Les troubles généralement observés chez l'abeille à la suite d'intoxications aux pesticides sont soit individuels (déficience de la mémoire et de l'orientation, difficultés d'apprentissage olfactifs et visuels, dysfonctionnement des cellules, modification de la thermorégulation et de l'activité musculaire, etc.), soit collectifs, donc observés sur la colonie (baisse d'activité des colonies et diminution de la productivité, dérégulation de la ponte de la reine, développement anormal du couvain, plus grande sensibilité aux maladies et parasites, etc. (35,50,57)).

Insecticides

Les insecticides néonicotinoïdes et pyréthrinoïdes possèdent des propriétés neurotoxiques. Les néonicotinoïdes agissent plus particulièrement sur le récepteur nicoti-

nique à l'acétylcholine. L'acétylcholine est le principal neurotransmetteur exciteur du système nerveux central des insectes, permettant une neurotransmission rapide. L'action des néonicotinoïdes provoque une hyper-excitation qui peut conduire à la mort de l'insecte en quelques minutes. De plus, les métabolites étant également toxiques et agissant sur le même récepteur, cela prolonge l'efficacité de ces insecticides (50). Les pyréthriinoïdes vont plutôt perturber la transmission synaptique (46). À faibles concentrations, les néonicotinoïdes et pyréthriinoïdes entraînent des effets sub-létaux (comportement/physiologie). Ainsi, les abeilles peuvent présenter une hyper-excitation, de l'ataxie (perturbation de l'équilibre et de la coordination motrice), des convulsions, des paralysies, etc. De plus, des troubles de la capacité d'apprentissage, de la mémoire et de l'orientation peuvent également être observés. Au niveau de la colonie, les butineuses peuvent présenter des difficultés à revenir à la ruche ou une réduction de l'activité de butinage. Le temps consacré à l'entretien du couvain peut également être réduit, au profit de l'auto-nettoyage, entraînant une diminution du nombre de larves poursuivant un développement normal. Les pyréthriinoïdes peuvent également entraîner des perturbations de la ponte de la reine, qui peut par exemple pondre plusieurs œufs dans la même cellule (46,50,69).

Fongicides

Les fongicides, tel que le boscalide, agissent en inhibant la respiration mitochondriale des champignons. Cependant, ils pourraient avoir une incidence sur les systèmes sensoriels des abeilles et ainsi interférer dans leur capacité de reconnaissance au sein de la ruche (70) ou encore troubler leur sens olfactif (71). Au sein de la ruche, la présence de fongicide pourrait perturber le développement voire entraîner la mort des larves et nymphes (72), ou encore entraîner des malformations chez les adultes ayant été exposés à l'état de larve (73). De plus, en association avec d'autres pesticides comme les insecticides, ils pourraient avoir une incidence sur la thermorégulation des abeilles, engendrant par exemple une hypothermie (74).

Outre ces effets directs sur les abeilles, les fongicides sont à l'origine d'une diminution des effectifs et de la diversité de champignons bénéfiques présents dans la ruche. Ces derniers joueraient un double rôle au sein des ruches. Ils permettraient, d'une part, de protéger la colonie contre certaines maladies telle que le symptôme du « couvain plâtré » ou ascophérose (mycose) qui est dû au développement du champignon *Ascophaera apis* (75). D'autre part, ils sont indispensables à l'élaboration du pain d'abeille, qui consiste en une fermentation du pollen. La présence de fongicides au sein du pollen aurait pour conséquence une détérioration de la qualité du pain

d'abeille. Bien que la diminution des effectifs de champignons au sein de la ruche ait été prouvée, l'incidence de celle-ci n'a pas encore été étudiée sur le long-terme.

Au regard de ces informations, il apparaît donc indispensable d'évaluer la présence de ces composés au sein des ruches.

3.2.2. Toxicités des pesticides étudiés

Afin d'avoir une estimation des toxicités aiguës vis-à-vis des abeilles des trois familles de pesticides étudiées dans ce manuscrit, le Tableau I-1 donne les valeurs de DL50 (orale et contact). Ces valeurs, renseignées ici à titre indicatif, correspondent à celles répertoriées sur le site Agritox (76), dont les données sont majoritairement (80 %) issues des dossiers de demande d'autorisation de mise sur le marché déposés par les industriels aux niveaux français et européen (77).

Afin d'évaluer la toxicité aiguë de substances sur les abeilles, ces dernières sont prélevées sur les cadres de ruche puis divisées par lots dans des cagettes. Elles sont ensuite exposées, en une seule fois par ingestion (DL50 orale) ou par contact (DL50 contact), à des doses croissantes de la substance testée. La mortalité induite après 48h est ensuite évaluée.

Il faut noter, cependant, qu'il peut exister une variabilité, pour un même composé, entre les valeurs indiquées dans ce tableau et celles reportées dans la littérature. Ceci peut être dû, par exemple, à des différences dans le protocole de détermination et/ou à l'état de santé des abeilles des colonies testées.

Selon la classification de l'Agence de Protection de l'Environnement (EPA), les pesticides sont classés en quatre catégories : ceux appartenant à la classe I sont sévèrement à extrêmement toxiques, ceux de la classe II sont modérément toxiques, ceux de la classe III sont légèrement toxiques et enfin, ceux de la classe IV sont très peu ou pas toxiques (78).

Tableau I-1 Toxicité aiguë (DL50 contact et orale sur 48h) des pesticides étudiés sur les abeilles (*Apis mellifera*), d'après (76)

Famille	Substance	DL50 contact (µg/abeille)	DL50 orale (µg/abeille)	Classe
Néonicotinoïde	Imidaclopride	0,081	0,0037	I
	Oléfine-imidaclopride	/	/	/
	5-hydroxy-imidaclopride	/	/	/
	Acide-6-chloronicotinique	/	/	/
	Thiaméthoxame	0,024	0,005	I
	Clothianidine	0,04426	0,00379	I
	Acétamipride	8,09	14,53	II
	Thiaclopride	38,82	17,32	II
Carboxamide	Boscalide	> 200	> 166	III
Pyréthri-noïde	Bifenthrine	0,015	0,1	I
	Deltaméthrine	0,0015	0,079	I
	Cyperméthrine	0,020	0,035	I
	Lambda-cyhalothrine	0,038	0,91	I

4. Études sur la présence de pesticides dans les matrices apicoles

De nombreuses équipes de recherche à travers le monde se sont intéressées à la présence de pesticides dans les matrices apicoles.

4.1. Matrices étudiées

Les études peuvent traiter d'une seule ou de plusieurs matrices, et s'intéressent ainsi principalement aux abeilles (3,22,79–86), au miel (3,22–25,82,83,87–90) et au pollen (3,22,82–85,91,92). D'autres, moins nombreuses, s'intéressent à la cire d'abeille (25,29,82,84,85,89,93–95), au pain d'abeille (94,96), à la propolis (25,97,98) et à la gelée royale (99).

Cependant, il existe des disparités quant au nombre d'études consacrées à l'analyse de pesticides dans chaque matrice (Figure I-24). De plus, aucune étude n'a été réalisée sur l'ensemble de ces matrices.

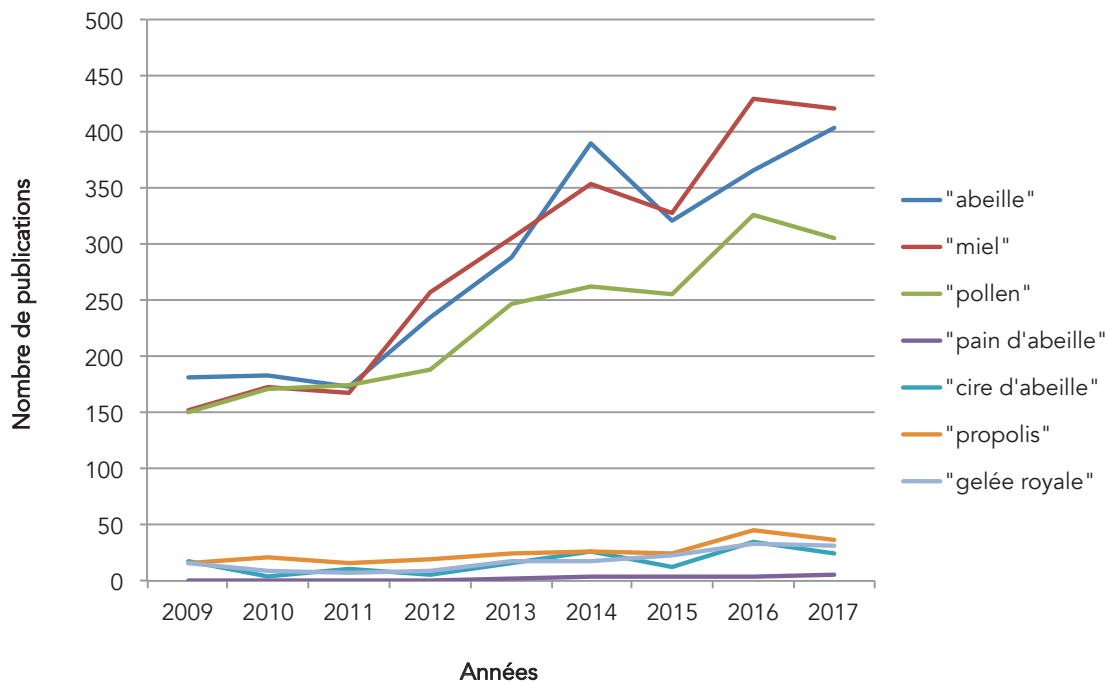


Figure I-24 Nombre de publications obtenues en résultats suite à la recherche par mots clés relatives aux pesticides dans les matrices apicoles - Recherche effectuée sur ScienceDirect.com le 23.07.17

4.2. Type d'analyses effectuées et molécules analysées

Les analyses reportées dans la littérature s'intéressent soit à une seule famille de molécule (82,83,87,89,95), soit à des molécules appartenant à plusieurs familles (analyse multi-résidus) (3,22–25,29,80,81,84–86,88,90–94,96–99). En ce qui concerne les molécules analysées, il peut s'agir de molécules mères uniquement ou dans une moindre mesure, de molécules mères et de leurs produits de dégradation et/ou de métabolisation.

La nature des pesticides analysés peut correspondre soit aux produits utilisés par les apiculteurs au sein de la ruche pour traiter par exemple les parasites tels que le *Varroa destructor* (89), soit aux pesticides utilisés dans l'environnement direct des ruches, notamment dans le monde agricole (85,92,95,97). Certaines équipes étudient, quant à elles, un nombre important de molécules pouvant appartenir à la fois aux composés antiparasitaires utilisés par les apiculteurs et aux composés utilisés dans le monde agricole (3,86,98).

4.3. Exemple de résultats

Dans l'étude de Mullin *et al.* (84) menée aux USA et au Canada, 118 pesticides et métabolites sont retrouvés dans les différentes matrices apicoles analysées (abeille, cire, pollen), avec un maximum de 31 pesticides pour un seul échantillon de pollen, et des concentrations pouvant atteindre 98 900 ng.g⁻¹ pour le pollen, 204 000 ng.g⁻¹ pour la cire, et 19 600 ng.g⁻¹ pour les abeilles.

L'étude de Wiest *et al.* (3), menée en France, fait état de la présence de 36 composés différents dans les matrices étudiées (abeille, miel, pollen) dont 10 sont retrouvés dans toutes les matrices. En ce qui concerne les concentrations maximales, elles sont de 116 ng.g⁻¹ pour le miel, 2 419 ng.g⁻¹ pour les abeilles et 3 674 ng.g⁻¹ pour le pollen.

Plus récemment, en 2014, l'étude de Kasiotis *et al.* (22), menée en Grèce, a montré la présence de 14 pesticides différents dans chacune des matrices analysées (abeille, miel, pollen), avec des concentrations atteignant plus de 1 200 ng.g⁻¹ pour le pollen, 81,5 ng.g⁻¹ pour les abeilles et 1,6 ng.g⁻¹ pour le miel.

Conclusion

En conclusion, les abeilles, par leur rôle de pollinisatrices, sont exposées à de nombreux xénobiotiques notamment pesticides. Parmi ces substances, certaines mises sur le marché ces 20 dernières années, comme les néonicotinoïdes, les pyréthri-noïdes et le boscalide, ont été mises en causes dans les phénomènes de mortalités anormales (> 20 %) observées dans les ruchers au niveau mondial.

Aucune des matrices apicoles n'étant épargnée par la présence des pesticides, apicoles ou agricoles, cela confirme leur rôle de sentinelle de l'environnement. Ces composés sont retrouvés en grand nombre et à de très larges gammes de concentrations, allant jusqu'à l'ultra-trace. De ce fait, des outils analytiques performants sont indispensables afin, d'une part, d'évaluer la contamination des ruchers, et d'autre part, de permettre aux écotoxicologues l'étude de la toxicité de ces composés vis-à-vis des abeilles.

**Chapitre II. Quantification de
traces de pesticides dans
les matrices apicoles**

1. Introduction et objectifs de l'étude

Ce deuxième chapitre s'intéresse au développement d'une méthode d'analyse des trois familles de pesticides ciblées par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse triple quadripôle (UHPLC-QqQ) dans la cire d'abeille.

Les défis analytiques résident dans le développement d'une méthode simple, rapide et robuste pour des composés appartenant à plusieurs familles de pesticides, souvent présents à l'état de traces, dans une matrice environnementale très complexe.

La finalité de cette étude est d'analyser des échantillons de cire provenant de colonies présentant des troubles. Compilés aux résultats obtenus pour les autres matrices, abeilles et pain d'abeille, les données dans la cire permettront de quantifier la présence globale de ces composés au sein des ruchers.

2. Extraction et analyse des pesticides dans la cire

2.1. Préparation d'échantillon, extraction et purification

La préparation de l'échantillon et l'extraction des composés d'intérêt à partir de la matrice sont des étapes essentielles de l'analyse. Il s'agit bien souvent du point le plus délicat de tout le protocole analytique et qui nécessite une optimisation rigoureuse et précise de chaque étape.

2.1.1. Préparation de l'échantillon

Lorsque les prélèvements de cire de corps sont effectués, un morceau de cadre est découpé. Certaines études réalisent l'extraction directement sur un morceau de cadre de ruche, comme par exemple Bonzini *et al.* (100). Or la cire d'abeille servant de matériaux de construction au sein de la ruche – pour notamment la création des alvéoles dans lesquelles les abeilles stockent le miel, le pollen, et dans lesquelles la reine effectue sa ponte – il n'est pas rare d'y retrouver des traces de miel, pollen, larves et/ou débris végétaux.

Adamczyk *et al.* (101) utilisent de l'eau pour nettoyer la cire afin d'en éliminer les résidus de miel, puis la sèchent avant de réaliser l'extraction. D'autres études, comme celle de Lodesani *et al.* (102), utilisent un four dans lequel la cire est fondue à 80 °C,

puis filtrée. Lenicek *et al.* (103) utilisent, quant à eux, une technique qui combine les deux méthodes précédemment énoncées, et qui consiste à faire chauffer un mélange d'échantillon de cire et d'eau, à une température comprise entre 80 et 100 °C, puis à filtrer ce mélange. La cire est alors récupérée une fois re-solidifiée. Enfin, les travaux de Tsigouri *et al.* (104), rapportent l'utilisation d'un cuiseur vapeur électrique pour faire fondre la cire et la récupérer dans un bécher.

Les protocoles de récupération de la cire faisant intervenir de l'eau, bien qu'étant efficaces pour éliminer le miel, semblent néanmoins non adaptés à notre problématique. En effet, l'emploi d'un solvant polaire comme l'eau, conduirait à l'extraction des composés polaires et moyennement polaires présents dans la matrice, y compris certaines molécules d'intérêts. En revanche, la filtration de la cire fondue, même si celle-ci nécessite une étape de chauffage risquant de dégrader certaines molécules, semble être un bon compromis pour récupérer la cire exempte d'impuretés.

2.1.2.Extraction

L'objectif de l'étape d'extraction est d'isoler quantitativement les composés ciblés à partir de la matrice, sans modifier leurs formes chimiques.

La majorité des techniques d'extraction reportées pour la cire sont réalisées par extraction solide-liquide (SLE) (29,85,89,95,100,101,105,106), extraction liquide-liquide (LLE) (107,108) ou bien par une combinaison des deux, l'extraction liquide-liquide jouant le rôle de purification (29,89). Voici les principes généraux de ces méthodes d'extraction.

Extraction Solide-Liquide (SLE)

L'extraction solide-liquide est réalisée par la mise en contact de la cire avec un solvant d'extraction. De la nature du solvant et du temps de contact entre la cire et le solvant dépend le transfert des analytes. La récupération du solvant est réalisée par une séparation mécanique des deux phases, par exemple *via* une filtration, une centrifugation, etc.

Extraction Liquide-Liquide (LLE)

L'extraction liquide-liquide met en jeu deux solvants non-miscibles. Elle repose sur la différence de solubilité des composés présents dans les deux phases. Ce type d'extraction est généralement utilisé pour extraire des composés présents dans l'eau, mais peut également permettre l'extraction de composés d'un solvant organique vers

un autre. Les inconvénients majeurs de cette technique sont un temps de manipulation généralement long et l'utilisation d'une quantité importante de solvant.

Extraction Liquide-Liquide sur Support Solide (SSLLE)

Dans un premier temps, la solution contenant les composés à extraire est déposée sur une colonne contenant un support solide inerte tel que la terre de diatomée. La solution s'adsorbe à la surface du support et forme un film contenant les composés à extraire. Ceci permet notamment d'augmenter la surface d'échange entre les deux liquides. La seconde étape consiste à éluer les composés en déposant le solvant d'extraction en tête de colonne. L'élution s'effectue par gravité. Cette méthode permet de limiter la quantité de solvant utilisé mais l'élution peut se révéler longue, en fonction de la capacité de la colonne.

Extraction « Matrix Solid-Phase Dispersion » (MSPD)

L'extraction MSPD consiste à mélanger manuellement la cire avec un support inerte comme par exemple de la terre de diatomée. Puis ce mélange échantillon/support est transféré dans une colonne vide puis tassé. L'élution est ensuite réalisée par ajout du solvant d'extraction en tête de colonne, comme pour l'extraction liquide-liquide sur support solide et présente donc les mêmes avantages et inconvénients.

Extraction « Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe » (QuEChERS)

L'extraction QuEChERS, basée sur les travaux de Anastassiades *et al.* (109) et destinée initialement à l'analyse des pesticides dans les fruits et légumes, consiste en une extraction liquide-liquide assistée par des sels, suivie d'une purification par « dispersive Solid-Phase Extraction (dSPE) ». La première étape est réalisée *via* l'utilisation d'un solvant organique (souvent l'acétonitrile) puis l'ajout de sels et d'un tampon qui induisent une séparation des phases aqueuse et organique. Les composés d'intérêt vont préférentiellement se trouver dans la phase organique qui sera ensuite purifiée par une dSPE.

Comparaison des extractions

La Figure II-1 permet de visualiser la répartition des volumes de solvant utilisés dans les études citées précédemment. Exceptée l'étude de Martel *et al.* (89) rapportant un volume extrêmement élevé (1246 mL), les volumes utilisés sont globalement inférieurs à 70 mL, et la moitié des études reportent des volumes inférieurs à 15 mL.

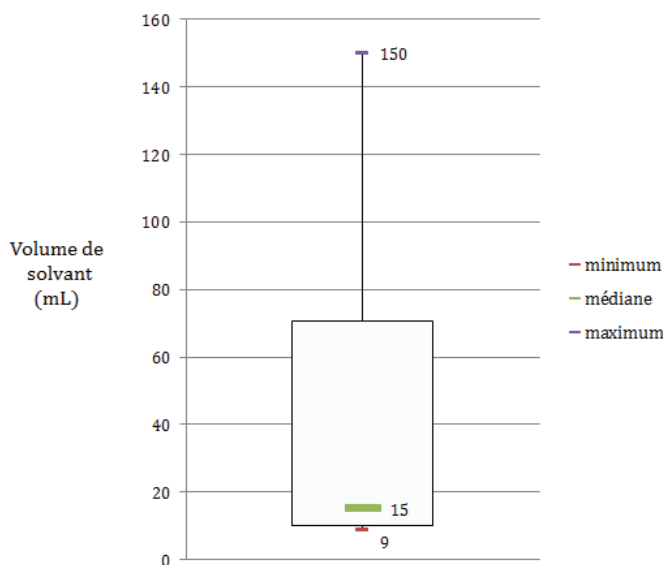


Figure II-1 Répartition des volumes de solvant utilisés pour l'extraction de pesticides dans la cire, d'après la littérature

Ces volumes de solvant dépendant également de la quantité de cire à extraire, il apparaît judicieux de déterminer le rapport entre le volume de solvant utilisé et la quantité de cire à extraire (V/Q) afin de réaliser les comparaisons. En ce qui concerne la quantité de cire, la majorité des études réalisent l'extraction à partir de 1 à 2 g. Pour ce paramètre, la quantité dépend bien souvent des possibilités des apiculteurs de prélever une surface importante ou non de cadre de ruche. La Figure II-2 présente les résultats obtenus après la détermination du rapport V/Q .

L'extraction LLE, qui nécessite souvent l'utilisation d'ampoules à décanter, est la plus contraignante à mettre en place, particulièrement difficilement applicable de façon quotidienne dans un laboratoire ou lorsqu'un grand nombre d'échantillons doit être extrait. De plus, cette méthode engendre généralement une grande consommation de solvant organique (Figure II-2), c'est le cas des techniques LLE-2 à LLE-4

(29,107,108) dont les rapports V/Q sont de 75 mL.g⁻¹ pour LLE-2, 110 mL.g⁻¹ pour LLE-3, et de 415 mL.g⁻¹ pour LLE-4. Seule la méthode LLE-1 (95) utilise un rapport V/Q moyen avec 23 mL.g⁻¹.

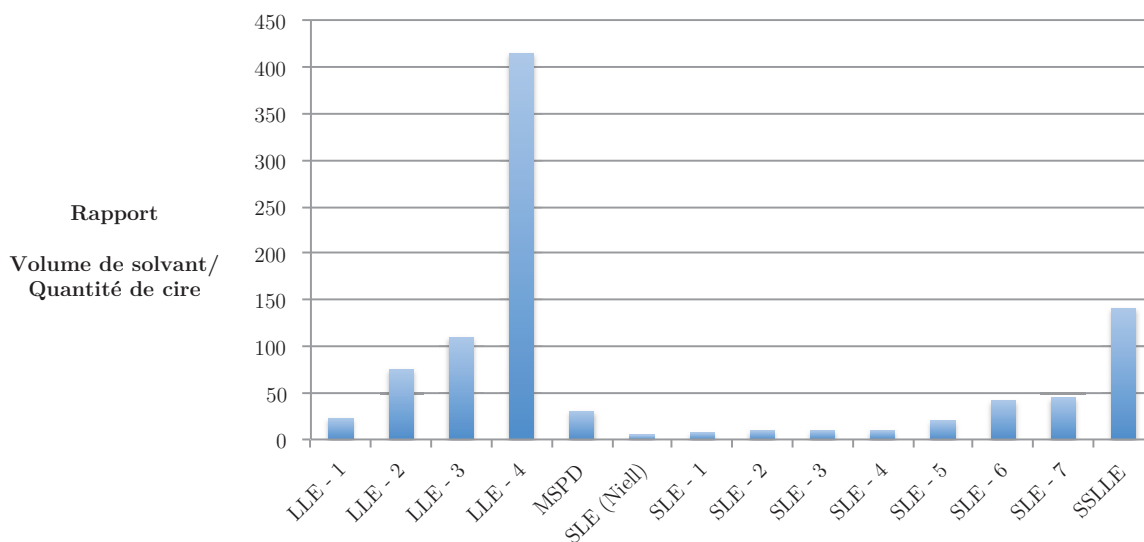


Figure II-2 Détermination du rapport Volume de solvant/Quantité de cire (V/Q) pour chaque étude citée (mL.g⁻¹)

L'extraction SSLLE, décrite par Tsigouri *et al.* (104), présente un rapport V/Q de 141 mL.g⁻¹, ce qui est relativement proche des volumes précédemment mentionnés. Bien qu'il s'agisse d'une méthode impliquant des colonnes à usage unique et qu'il existe des supports adaptés à l'extraction simultanée de plusieurs échantillons, cette technique n'est pas adaptée à des analyses de routine. En effet, elle nécessite un temps de manipulation considérable puisque quatre éluions sont nécessaires afin d'obtenir des rendements satisfaisants (compris entre 77 % et 87 %) et que chaque élution est réalisée par gravité.

La méthode MSPD de l'étude de Lodesani *et al.* (102) utilise au total 91 mL de solvant (dont 70 mL pour l'élution), ce qui peut sembler élevé, mais qui d'un point de vue du rapport V/Q (30,3 mL.g⁻¹) est dans la moyenne. En pratique, cette technique ne semble pas adaptée au traitement d'un grand nombre d'échantillons. En effet, chaque échantillon doit être mélangé au support inerte puis chargé et tassé dans une colonne vide avant l'élution d'un volume de 70 mL de solvant réalisée par gravité.

L'étude de Niell *et al.* (93) est une extraction solide-liquide à l'acétonitrile suivie d'une purification par dSPE. Finalement, le protocole utilisé par Niell *et al.* utilise au total une dizaine de millilitres de solvant, ce qui correspond au plus faible rapport V/Q puisqu'il est de 5 mL.g⁻¹.

Généralement, l'extraction solide-liquide, qui est la plus reportée (29,85,89,100,101,105,106), utilise des quantités de solvant comprises entre 9 et 46 mL, sauf pour l'étude de Chauzat *et al.* (29) qui utilise une plus grande quantité (au total 84 mL) et celle décrite par Martel *et al.* (89) (au total 1246 mL dû à l'étape de purification par LLE). Si l'on regarde les rapports V/Q de ces études, ils sont compris entre 7,5 mL.g⁻¹ et 45 mL.g⁻¹.

Il s'agit donc d'une méthode adaptée à notre problématique qui était de développer une méthode applicable à des analyses d'un grand nombre d'échantillons.

L'un des défis de notre étude a donc été de développer une méthode d'extraction qui limite la consommation de solvants organiques, tout en étant efficace, pratique et peu chère afin d'être adaptée à une utilisation en routine.

2.1.3. Purification

La purification est une étape post-extraction importante dans le processus analytique. Les matrices peuvent contenir des centaines de molécules pouvant interférer avec les composés d'intérêt. Cela est particulièrement vrai lorsque l'analyte est présent à une concentration bien inférieure à celles des interférents matriciels. De plus, ces interférents peuvent entraîner une détérioration de la colonne chromatographique ou encrasser la source. Une étape de purification est donc nécessaire avant l'analyse instrumentale.

Il existe plusieurs méthodes de purification, dont trois sont reportées dans le cadre de l'extraction de la cire d'abeille : l'extraction sur phase solide (ou SPE), l'extraction sur phase solide dispersive (ou dSPE) et la LLE.

La SPE permet l'extraction, la purification ou la concentration des composés d'intérêt présents dans des matrices liquides (échantillons ou extraits). La SPE est un processus de séparation reposant sur la différence d'affinité des analytes entre une phase solide, souvent contenue dans une cartouche, et une phase liquide percolant à travers cette phase stationnaire. Deux stratégies peuvent être envisagées :

- les analytes sont retenus par la phase stationnaire, les impuretés sont alors éliminées avec un premier solvant d'élution ; puis un second solvant d'élution permet de récupérer les composés à analyser ;
- les impuretés sont retenues par la cartouche et les composés d'intérêt sont immédiatement récupérés en sortie de cartouche ou après élution.

Il existe plusieurs natures de phases SPE qui font intervenir des phénomènes de rétention différents (phase normale, phase inverse, phase d'échange d'ions, phase d'adsorption).

La dSPE repose, quant à elle, uniquement sur la rétention des impuretés. Contrairement à la SPE, la dSPE n'est pas conditionnée sous forme de cartouche mais sous forme dispersive. En fonction de la nature de la phase dSPE, celle-ci pourra retenir préférentiellement (liste non-exhaustive) :

- les composés lipidiques : dans ce cas, des phases contenant des amines primaires et secondaires (PSA), seules ou associées à une phase C18, sont recommandées ;
- les composés entraînant une coloration de l'extrait (par exemple la chlorophylle) : l'utilisation de phases contenant du carbone graphitisé (« Graphitized Carbon Black ou GCB ») est alors conseillée.

Lorsque cela est nécessaire, les phases peuvent être combinées. Ainsi, un extrait présentant des résidus lipidiques et une forte coloration pourra être purifié à partir d'une phase contenant PSA, C18 et GCB.

L'utilisation de la dSPE présente l'avantage d'être pratique et rapide à mettre en place, puisqu'il suffit d'ajouter l'extrait à purifier dans un tube contenant préalablement les phases de dSPE, d'agiter et de centrifuger pour récupérer l'extrait purifié. De plus, la dSPE ne nécessite pas d'ajout de solvant.

L'extraction liquide-liquide peut être utilisée pour purifier un liquide issu d'une première étape d'extraction (89). Cependant, cette méthode est peu répandue.

L'étape de purification n'est pas toujours indispensable et dépend de l'extraction réalisée, de l'analyse qui suivra et de la sensibilité recherchée. Par exemple, le protocole présenté par Lodesani *et al.* (102), dont l'extraction de la cire consistait en une MSPD, ne fait pas référence à une étape de purification supplémentaire avant l'analyse des acaricides par chromatographie en phase gazeuse (GC).

Les études reportant l'analyse de pesticides communs à notre étude font presque toutes référence à l'utilisation d'une étape de purification à la suite de l'extraction de la cire. Plusieurs d'entre elles utilisent la dSPE. Ainsi, Li *et al.* (85) utilisent un mélange Z-sep/C18, spécialement adaptée à la purification de matrices fortement lipidiques, pour l'analyse de 11 pesticides par GC dont la bifenthrine, la lambda-cyhalothrine, la perméthrine et la cyperméthrine. Niell *et al.* (93) utilisent une phase contenant un mélange PSA/C18 en vue de l'analyse de 38 pesticides par LC dont le boscalide, la lambda-cyhalothrine, l'imidaclopride, le thiaclopride et le thiaméthoxame. Tene *et al.* (108) utilisent, quant à eux, une dSPE contenant la phase Florisil pour l'analyse en GC de plusieurs pyréthrinoïdes dont la bifenthrine, la lambda-cyhalothrine et la cyperméthrine.

Une autre étude (29) présente une étape de purification par SPE, qui consiste en une cartouche de type C18. L'étude reporte l'analyse de plusieurs pesticides par GC dont la cyperméthrine et la deltaméthrine.

Seulement deux références n'utilisent pas d'étape de purification. Il s'agit du protocole présenté par Yanez *et al.* (95), dont l'étude consiste à analyser 7 néonicotinoïdes dont le thiaméthoxame, la clothianidine, l'imidaclopride, l'acétamipride et le thiaclopride, dans la cire, et de celui de Lodesani *et al.* (102), traitant de l'analyse de résidus d'acaricides dans la cire.

Une purification (supplémentaire ou préalable) peut être réalisée, en congelant le mélange cire/solvant. En effet, ceci permet de limiter la présence de composés matriciels dans l'extrait final en solidifiant les particules de cire. Ainsi, les études (29,85,89,93,100,101,105,106) alternent des étapes de congélations et de centrifugations.

Le choix de la méthode de purification dépend donc de la nature des composés à analyser, de la sensibilité à atteindre et de la technique d'analyse utilisée.

2.2. Analyse : Séparation et détection

2.2.1. Séparation par chromatographie

Deux méthodes séparatives sont principalement reportées dans la littérature pour l'analyse des pesticides présents dans notre étude : la chromatographie en phase liquide (LC) et la chromatographie en phase gazeuse (GC). Notre étude ayant pour

objectif l'analyse des 13 pesticides ciblés par LC, seule l'utilisation de la chromatographie en phase liquide sera détaillée dans ce chapitre.

La LC est basée sur des interactions entre une phase stationnaire, une phase mobile et les solutés. L'échantillon est injecté dans la phase mobile liquide en contact avec la phase stationnaire contenue dans une colonne de géométrie variable. Les solutés se répartissent selon leur affinité pour la phase mobile et la phase stationnaire, et sont ainsi séparés.

Deux types de phases stationnaires existent :

- la phase normale : elle est polaire, constituée de gel de silice ayant à sa surface des groupes silanols (-Si-OH) et siloxanes (-Si-O-Si-) sur lesquels peuvent être greffés des groupements tels que amine (-NH₂), carbonitrile (-CN), diol [(-CHOH)-CH₂OH], permettant à la silice de retenir les composés à analyser par des liaisons hydrogène. Cette phase sert principalement à séparer des composés polaires par l'utilisation d'un éluant apolaire ;
- la phase inverse : c'est une phase normale greffée avec chaînes alkyles de C₄ à C₃₀ (le plus souvent C₈ et C₁₈) sur les groupements silanols. Une phase C18 sera par exemple de la forme: -Si-O-Si(CH₃)₂-(CH₂)₁₇-CH₃

Un éluant polaire est utilisé et ce sont les composés polaires qui sont élués en premier.

L'élution peut être réalisée selon deux modes. En mode isocratique, la composition de la phase mobile est inchangée tout au long de l'analyse alors qu'en mode gradient la composition de la phase mobile varie au cours de l'analyse. Ce dernier mode, le plus employé, permet d'une part d'améliorer la séparation des analytes et la forme des pics des composés éluant tardivement, et d'autre part de raccourcir le temps d'analyse.

Introduite en 2004 par la société Waters, « l'Ultra Performance Liquid Chromatography » (UPLC®) permet d'augmenter la résolution, la vitesse et la sensibilité par rapport à « l'High Performance Liquid Chromatography » (HPLC). Le principe de l'UPLC est basé sur l'utilisation de colonnes remplies de particules de petits diamètres (< 2,5 µm). En terme de performances, la diminution de la taille des particules entraîne une augmentation du nombre de plateaux théoriques et une diminution du temps de rétention, ce qui améliore la qualité de la séparation tout en réduisant le temps d'analyse. Pour compenser l'augmentation de la pression induite, il est possible d'augmenter la température, ce qui a pour effet de diminuer la viscosité de la phase mobile et donc de diminuer la pression tout en augmentant la vitesse linéaire opti-

male et donc le débit. Les colonnes utilisées sont généralement de faible diamètre (1 à 2,1 mm) et doivent être particulièrement résistantes à la pression. L'utilisation de ce type de colonne permet d'obtenir une grande efficacité de séparation et une grande sensibilité.

Les pyréthriinoïdes sont généralement analysés par GC (110–112). Cependant, des études ont montré que la GC était source de dégradation et d'isomérisation pour les pyréthriinoïdes (113,114). Ainsi, notre laboratoire a développé une méthode d'analyse de ces molécules par LC (96).

Les néonicotinoïdes sont, quant à eux, analysés par LC (95,115,116). En ce qui concerne le boscalide, les deux techniques de séparation sont reportées : la GC, par exemple dans les travaux de Munitz *et al.* (117) ou Lagunas-Allué *et al.* (118), et la LC dans les études réalisées par Kasiotis *et al.* (22) ou par De Oliveira Silva *et al.* (119).

Dans l'objectif d'une analyse multi-résidus de ces composés, nous avons utilisé la chromatographie en phase liquide.

2.2.2. Détection par spectrométrie de masse

Les systèmes de détection pouvant être couplés à la LC et la GC sont variés et possèdent des sensibilités spécifiques. Cependant, seule la détection par spectrométrie de masse (MS) est universelle pour une majorité de molécules et permet une grande sensibilité ainsi qu'une spécificité élevée, notamment lorsqu'elle est utilisée en tandem (MS/MS).

Cette technique de détection a l'avantage, comparé à d'autres types de détecteurs tels que les détecteurs optiques comme l'UV, d'apporter des informations structurales. En effet, en spectrométrie de masse, les rapports masse sur charge (m/z) et les produits de fragmentation sont obtenus, permettant de confirmer l'identité des composés analysés (120). Ces qualités en font donc une technique de choix pour le développement de méthodes quantitatives de molécules présentes à de faibles concentrations. Elle est de ce fait devenue incontournable en analyse environnementale.

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse qui permet l'identification et la quantification de composés organiques sur la base de la détermination de leurs masses moléculaires. Elle est fondée sur la séparation et la détection d'ions formés dans une source d'ionisation ou dans une cellule de collision, en fonction de leur m/z .

Un spectromètre de masse est constitué de quatre éléments principaux :

- une source d'ionisation qui va permettre de produire les ions,
- un analyseur qui va séparer les ions produits en fonction du rapport m/z ,
- un détecteur qui convertit le courant ionique en courant électrique,
- un système de traitement informatique des données permettant d'obtenir un spectre de masse (intensités des ions en fonction de leur rapport m/z).

Plusieurs modes d'ionisation existent, dont les deux principaux lorsque couplés à la LC, sont l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) et l'ionisation électrospray (ESI). Notre étude faisant uniquement appel à l'utilisation de la source ESI, seul son principe sera présenté.

L'ionisation par ESI, dont le mécanisme est présenté dans la Figure II-3, est obtenue par application d'un fort courant électrique, sous pression atmosphérique, au liquide passant à faible débit (1 à 10 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) dans un capillaire. Le courant est obtenu en appliquant une différence de potentiel (3 à 6 kV) entre le capillaire et une contre-électrode, séparés de 0,3 à 2 cm. Ceci crée un champ électrique qui engendre une accumulation de charge à la surface du liquide se trouvant à la sortie du capillaire. Cette accumulation de charge entraîne la déformation du liquide qui se traduit par l'apparition d'un cône de Taylor, puis sa rupture par répulsion électrostatique et sa décomposition en gouttelettes chargées.

Un gaz, qui est injecté à faible débit et de façon co-axiale au capillaire, permet de limiter la dispersion du spray. Ces gouttelettes passent ensuite à travers un rideau de gaz inerte et chauffé, généralement de l'azote dirigé à contre-courant du trajet des ions, dans le but d'éliminer les dernières molécules de solvant.

Cette élimination du solvant cause un rétrécissement des gouttelettes et donc une augmentation de la charge par unité de volume, jusqu'à ce que la limite de Rayleigh soit atteinte. Cette limite correspond à la taille critique pour laquelle les répulsions coulombiennes entre les charges deviennent égales puis supérieures aux forces cohésives de la tension de surface du liquide. Les gouttelettes vont alors se déformer jusqu'à se rompre en des gouttelettes plus petites. Ce phénomène se poursuit sur ces dernières, et ainsi de suite, jusqu'à ce que le champ électrique à leur surface soit assez important pour permettre la désorption des ions qu'elles contiennent.

Deux modes d'ionisation existent: le mode positif (ESI+) et le mode négatif (ESI-). En mode positif, le capillaire devient le siège d'oxydation où sont retenus les anions

tandis que les cations sont repoussés dans l'extrémité du cône de Taylor et inversement en mode négatif.

Ces modes permettent de produire respectivement des ions chargés positivement ou des ions chargés négativement. La charge positive est souvent un adduit de proton (H^+) mais peut aussi être un adduit de sodium (Na^+), de potassium (K^+) ou d'ammonium (NH_4^+). Il est conseillé, lorsque le mode positif est utilisé, de travailler en milieu acide (donneur de protons) en ajoutant de l'acide acétique par exemple ou encore en travaillant en présence d'acétate d'ammonium afin de favoriser les adduits de type $[M+NH_4]^+$.

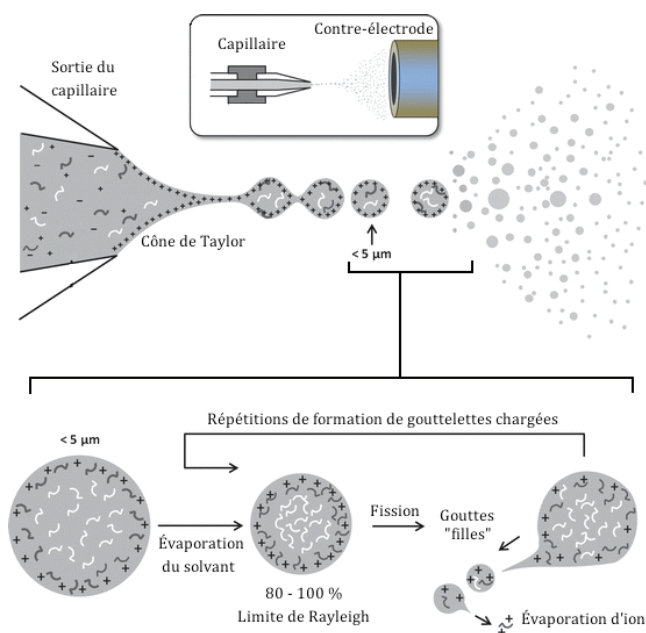


Figure II-3 Ionisation ESI - Théorie (d'après (121))

Les ions ainsi formés sont ensuite acheminés vers l'analyseur en passant dans un premier compartiment qui est sous pression réduite et non plus sous pression atmosphérique.

De la même façon que pour les sources d'ionisation, il existe une grande variété d'analyseurs. Notre étude sur la cire faisant uniquement référence à l'utilisation de l'analyseur triple quadripôle (QqQ), seul son principe sera présenté.

Le quadripôle utilise la stabilité des trajectoires pour séparer les ions selon leur m/z en fonction d'un champ électrique, combinaison d'une tension continue et d'une tension alternative. Le système employé résulte de l'association de deux analyseurs qua-

dripolaires (Q1 et Q3) en série, séparés par une cellule de collision (q2) correspondant à un quadripôle plus court (Figure II-4). Ce système est appelé triple quadripôle (QqQ). Travailler avec un spectromètre de masse de ce type permet de travailler soit en MS simple, soit en tandem (MS/MS).

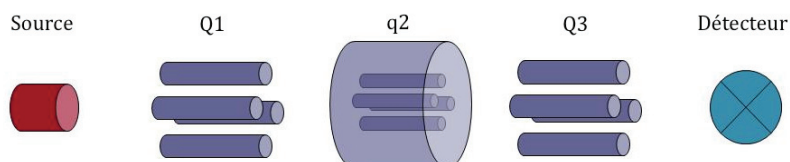


Figure II-4 Schéma d'un analyseur triple quadripôle

Dans le cas d'une analyse en mode MS simple, aucune tension alternative n'est appliquée sur le troisième quadripôle, ce qui a pour conséquence de le rendre « transparent » comme la cellule de collision. Deux modes d'analyses sont possibles : le mode balayage (full scan) où tous les ions formés sont observés, et le mode d'acquisition d'un rapport m/z donné (SIM, « Simple Ion Monitoring ») où certains ions formés sont sélectionnés.

Dans la configuration en tandem, les quadripôles (Q1 et Q3) sont « activés » et la cellule de collision est remplie de gaz inerte afin de fragmenter les ions sélectionnés par le premier analyseur (ion précurseur ou ion parent). Par ailleurs, l'analyse en tandem peut être menée selon différents modes de fonctionnement selon l'information recherchée :

- Mode descendant : l'ion parent est sélectionné en focalisant le premier analyseur sur son rapport m/z . Les fragments formés dans la cellule de collision sont séparés par le deuxième analyseur et analysés. Le spectre obtenu présente à la fois l'ion parent et ses ions fragments (ions fils) ;
- Mode ascendant : le premier analyseur balaie une gamme de masse tandis que le deuxième est focalisé sur un seul rapport m/z . Tous les ions générés en source et capables de donner un fragment de même rapport m/z seront détectés ;
- Mode perte de neutre : les deux analyseurs balaient une gamme de masse simultanément, mais avec un décalage de masse constant correspondant à la perte neutre suivie. Le spectre établi présentera alors tous les ions parents capables de se fragmenter en générant un neutre de masse égale au décalage imposé ;

- Mode « Multiple Reaction Monitoring » (MRM) (Figure II-5) : l'ion parent à étudier est sélectionné par le premier analyseur et fragmenté dans la cellule de collision, comme en mode descendant. En revanche, le second analyseur est focalisé sur l'ion produit. Ce mode de fonctionnement présente une double sélectivité à la fois de l'ion parent et de l'ion produit.

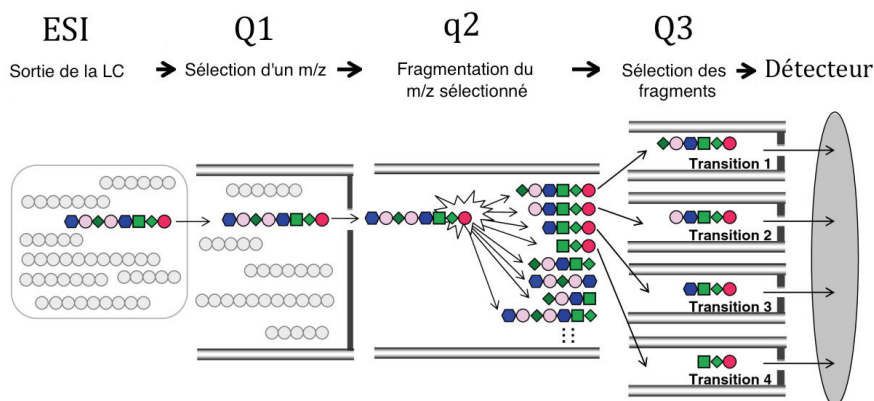


Figure II-5 Illustration du principe de fonctionnement du mode MRM (d'après (122))

Le mode d'acquisition sélectionné dans notre étude est le mode MRM. Il s'agit du mode de choix pour la quantification pour deux raisons. La première est la sélectivité (ion parent et ion(s) fils). La seconde est que ce mode permet de suivre précisément et simultanément les transitions MRM (ion parent => ion fils) de plusieurs ions parents.

2.3. Performances analytiques et validation de méthodes quantitatives

De nombreuses organisations et conférences internationales (ICH⁵, AOAC⁶, IUPAC⁷, FDA⁸, SANCO⁹, ...) ont élaboré des documents à propos de la caractérisation et de la validation des méthodes analytiques. Les recommandations de l'ICH ont été suivies pour les trois matrices (cire, abeille et pain d'abeille).

⁵ ICH : Conseil International d'Harmonisation

⁶ AOAC : Association des Chimistes Analystes Officiels

⁷ IUPAC : Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée

⁸ FDA : Administration des Aliments et des médicaments

⁹ SANCO : Santé et Consommateurs (Commission Européenne)

Les recommandations ICH font référence à plusieurs critères des méthodes analytiques devant être évalués : sélectivité, spécificité, précision, justesse, robustesse, linéarité, exactitude, limites de détection et de quantification. Ceux-ci sont abordés dans les paragraphes suivants.

2.3.1. Critères d'identification des composés : sélectivité et spécificité

La sélectivité est définie comme la capacité à identifier sans ambiguïté et à quantifier un composé d'intérêt dans un mélange complexe sans interférence provenant des autres composés présents dans la matrice, des impuretés ou encore des produits de dégradation. La méthode ainsi validée pourra donc être qualifiée de spécifique. (123)

L'identification des composés lors d'une analyse par LC-MS/MS en mode MRM doit être assurée. L'ICH recommande l'utilisation d'un minimum de trois points d'identification. Dans notre étude, chaque composé est caractérisé par :

- le temps de rétention (t_R)
- les deux transitions principales MRM1 et MRM2
- le rapport de ces deux transitions (MRM1/MRM2)

Le premier point d'identification concerne le temps de rétention. Notre choix a été de fixer une limite pour la variation du temps de rétention, entre l'étalon et le composé détecté dans l'échantillon, qui ne doit pas dépasser 2,5 %.

Le second critère d'identification concerne la présence des transitions MRM1 et MRM2. La transition MRM1 est la plus intense et est utilisée pour la quantification du composé. La transition MRM2 est la seconde plus intense et est employée pour confirmer l'identification du composé dans l'échantillon.

Pour finir, le troisième point d'identification est le rapport des transitions (MRM1/MRM2). Notre choix a été de fixer une limite pour la variation entre le rapport du composé dans l'échantillon et celui d'un standard analytique dans la même matrice, qui ne doit pas dépasser 20 %.

2.3.2. Précision

La précision caractérise le degré de concordance entre les valeurs mesurées obtenues par des mesures répétées sur les objets identiques ou similaires dans des conditions spécifiées (123). Trois critères peuvent être envisagés pour l'évaluation de la précision d'une méthode :

- la répétabilité
- la précision intermédiaire
- la reproductibilité

La différence entre ces critères correspond au nombre de facteurs variant entre chaque analyse.

Ainsi, la répétabilité (ou précision intra-jour) est obtenue en analysant des répliquats d'échantillon de même concentration, préparés indépendamment un même jour par le même manipulateur, avec le même équipement, analysés sur le même appareil de mesure, dans les mêmes conditions analytiques et dans un même laboratoire (124). Ce critère sera évalué, en réalisant des triplicats.

La précision intermédiaire (ou précision inter-jour) est obtenue en injectant des répliquats d'échantillon de même concentration préparés dans des conditions d'expérience différentes de celles qui ont permis d'évaluer la précision intra-jour (124). Il en résulte alors qu'au moins une des conditions d'extraction et/ou d'analyse s'en trouvent modifiées. Ainsi, le jour de l'analyse, le manipulateur, le stock de solution standard, le lot de solvant, l'appareil de mesure, le matériel d'extraction peuvent être différents. Dans notre étude, ce critère sera également évalué, en faisant varier le jour et le lot de solvant.

Et enfin, la reproductibilité de la méthode peut être déterminée si plusieurs laboratoires participent à l'étude et s'ils peuvent mettre en place la méthode. On parle alors d'essais inter-laboratoires. La reproductibilité correspond alors à l'étroitesse de l'accord entre les valeurs obtenues dans les différents laboratoires participant à l'étude (124). Ce niveau de précision ne sera pas déterminé dans le cadre de ces travaux.

2.3.3. Justesse

La justesse est associée à l'étroitesse de l'accord entre la valeur qui est acceptée comme valeur réelle conventionnelle ou comme valeur de référence acceptée, et la valeur mesurée expérimentalement – qui correspond à la valeur moyenne obtenue en appliquant la procédure d'analyse un certain nombre de fois (123). La justesse peut être exprimée comme un recouvrement ou comme la différence entre la valeur de concentration déterminée *via* l'équation de la droite de régression et la valeur de concentration vraie (théorique) en pourcentage. La justesse caractérise alors l'erreur systématique d'une mesure expérimentale par rapport à la valeur vraie.

Selon la directive ICH (124), la justesse de la méthode doit être évaluée en utilisant au minimum 3 niveaux de concentration, et pour chaque niveau de concentration, 3 mesures doivent être effectuées. Finalement, un minimum de 9 mesures (= 3 niveaux de concentrations x 3 réplicats d'extraction) est requis pour évaluer la justesse, ce qui a été réalisé ici.

2.3.4. Robustesse

La robustesse est associée à la capacité de la méthode analytique à ne pas être affectée par des variations minimales pouvant provenir de la variabilité de certains paramètres expérimentaux tels que le pH de la phase mobile ou encore la qualité du lot de solvant utilisé. La robustesse fournit une indication de la fiabilité de la méthode analytique durant une utilisation normale sur le long terme. Elle est contrôlée au cours de la phase de mise au point par l'analyste et doit démontrer que la méthode demeure fiable lorsqu'on introduit des variations planifiées de paramètres.

2.3.5. Rendements d'extraction

Le rendement d'extraction est généralement associé au rapport entre la concentration quantifiée à l'aide d'une calibration et la concentration théorique de dopage dans une matrice blanche, c'est-à-dire exempte de composés d'intérêt.

Ici, le rendement d'extraction est calculé en comparant des réplicats d'échantillons de matrice dopés avant la procédure d'extraction à des réplicats d'échantillons dits blancs, c'est-à-dire non initialement dopés en composés d'intérêt, extraits selon la même procédure d'extraction que les échantillons dopés avant extraction, puis dopés

à la concentration visée après extraction et juste avant l'étape d'évaporation. Le rendement d'extraction est calculé en faisant le rapport des aires des échantillons dopés avant extraction sur celles des échantillons dopés après extraction. Les rendements d'extractions (%) sont alors validés s'ils sont compris entre 70 et 120 %.

2.3.6. Effets de matrice

Les effets de matrice correspondent aux interférences du milieu analysé, sur le composé ciblé. Ils représentent la perturbation de l'ionisation des composés d'intérêt en spectrométrie de masse d'où l'intérêt de les évaluer.

Bien que l'évaluation des effets de matrice ne soit pas précisée dans l'ICH, pour certain auteurs, comme Krueve *et al.* (123), la détermination des effets matrices est essentielle, nécessaire et recommandée afin de valider une méthode. Lorsque la matrice est blanche, l'effet matrice (EM) peut se calculer selon l'Équation 1 (125), en comparant les réponses des échantillons dopés après extraction à celles obtenues dans le solvant à la même concentration, ce qui a été réalisé ici :

$$EM(\%) = \left(\frac{\text{Aire}_{\text{échantillon dopé après extraction}}}{\text{Aire}_{\text{étalon dans un solvant}}} - 1 \right) \times 100$$

Équation 1 Évaluation des effets de matrice EM (%), d'après (125)

Des effets de matrice négatifs traduisent une suppression du signal alors que des effets de matrice positifs traduisent une augmentation de signal.

2.3.7. Limites de détection et de quantification

Selon l'ICH (124), la limite de détection (LOD) est définie comme étant la plus faible concentration du composé d'intérêt pouvant être détectée mais non quantifiée comme une valeur exacte. La limite de quantification (LOQ) est associée à la plus petite concentration en molécules cibles pouvant être détectée et quantifiée.

Plusieurs approches existent afin de déterminer ces valeurs :

- Méthode visuelle : elle consiste à évaluer visuellement à partir de quel niveau de concentration l'opérateur pense pouvoir confirmer la présence ou certifier la concentration. Dépendant de l'opérateur, cette manière de déterminer les valeurs de LOD et LOQ est donc très subjective.

- Régression linéaire : elle est basée sur la dispersion des paramètres de régression linéaire obtenus lors de la calibration. Ainsi, si la relation de réponse est de type linéaire ($y = ax + b$), alors la LOD et la LOQ sont obtenues selon :

$$\text{LOD} = 3 \sigma_b/a \quad \text{et} \quad \text{LOQ} = 10 \sigma_b/a$$

Où σ_b est l'écart type de l'ordonnée à l'origine et a la pente de la droite de calibration

- Rapport signal sur bruit : les LOD et les LOQ sont déterminées comme la concentration d'analyte produisant un pic chromatographique avec un rapport signal sur bruit de trois et dix fois le bruit de fond respectivement. Il s'agit de la méthode la plus couramment utilisée

Dans notre étude, la méthode du rapport signal sur bruit a été choisie.

2.3.8. Modèle de régression

Les processus de validation de méthode recommandent également de valider la linéarité définie comme étant la capacité d'une méthode d'obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration de l'analyte dans l'échantillon. (123)

Ce terme linéarité du signal peut, dans le contexte du couplage LC-MS, avoir deux significations étroitement liées : (1) relation linéaire entre les signaux d'analyte et les concentrations d'analyte dans des étalons ; (2) relation linéaire entre les signaux d'analyte et les concentrations d'analyte dans des échantillons. Cette dernière signification, aussi appelée « matrix-matched », est de plus en plus utilisée car cette stratégie permet de tenir compte des effets de matrice lors de l'étalonnage. Nous l'avons donc utilisée. De plus, nous pouvons considérer que si le signal d'analyte dans les échantillons est linéaire alors il sera certainement linéaire dans des solutions d'étalonnage, tandis que l'inverse n'est pas nécessairement vrai. (123)

Selon l'ICH (124), il est conseillé d'évaluer la relation de réponse pour 5 niveaux de concentration au minimum, sur trois jours et d'effectuer par conséquent trois séries indépendantes de ces 5 niveaux de concentrations et ce, à raison d'une série par jour. Pour finir, il est suggéré de préparer chaque niveau de concentration en duplicats voire plus afin d'obtenir une courbe de calibration optimale. Afin d'évaluer la linéarité, l'ICH propose une évaluation visuelle en première estimation.

Une estimation visuelle de la linéarité ainsi que l'adéquation au modèle mathématique par l'utilisation du coefficient de détermination (r^2) a été réalisée dans notre étude.

3. Matériels et méthodes

Dans cette partie sont présentés les matériels et méthodes utilisés à la fois lors du développement de la méthode d'extraction et d'analyse de la cire d'abeille, et également ceux utilisés pour l'analyse des matrices abeilles et pain d'abeille.

3.1.Étalons et réactifs

3.1.1.Solvants

L'acétonitrile (ACN), le méthanol (MeOH), le formate et l'acétate d'ammonium, utilisés pour l'analyse par UHPLC-MS/MS, ont été obtenus pas le fournisseur Biosolve Chimie (Dieuze, France). Les solvants utilisés lors du développement de l'étape d'extraction tels que le diméthylsulfoxyde (DMSO), le pentane, le chloroforme, l'ACN, le dichlorométhane, l'heptane, le MeOH, l'acétone, le toluène et l'acétate d'éthyle; ainsi que les acides acétique et formique, la triéthylamine (TEA) et la solution d'hydroxyde d'ammonium (à 25 % dans l'eau) proviennent de Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). L'eau utilisée tout au long du processus analytique est purifiée par un système Milli-Q de marque Millipore (Saint-Quentin-en-Yvelines, France).

3.1.2.Etalons

Les étalons analytiques de l'imidaclopride, du thiaméthoxame, de la clothianidine, de l'acétamipride, du thiaclopride, de la bifenthrine, de la deltaméthrine, de la cyperméthrine, de la lambda-cyhalothrine, du boscalide, ainsi que les composés deutérés imidaclopride-d4 et perméthrine-d6, ont été obtenus chez Sigma-Aldrich. L'acide-6-chloronicotinique a été obtenu chez Dr Ehrenstorfer (Augsburg, Allemagne). Tous ces étalons présentent une pureté supérieure à 97,5 % excepté la cyperméthrine dont la pureté est de 92 %. L'oléfine-imidaclopride a, quant à lui, été synthétisé par la société OrgaLink (Magny les Hameaux, France). Le 5-hydroxy-imidaclopride a été fourni par l'INRA UMR 406 (Avignon, France).

3.1.3.Solutions mères

Les solutions mères ont été préparées dans l'ACN à une concentration de 1000 mg.L⁻¹, et stockées à une température de -18 °C pendant 12 mois. Les solutions étalons ont

été préparées par dilution des solutions mères individuelles, et sont également conservées à -18 °C pendant 6 mois.

3.1.4. Supports d'extraction et de purification

En ce qui concerne les supports d'extraction, des colonnes EXtrelut® de type NT20 de marque Merck Millipore (Darmstadt, Allemagne), ainsi que de la terre de diatomée (type hydromatrix) et des tubes à centrifuger de contenance 50 mL de chez Agilent Technologies (Massy, France) ont été utilisés. Les tampons utilisés lors des extractions QuEChERS sont des tampons citrate et acétate (Agilent Technologies). Le tampon acétate contient 1,5 g d'acétate de sodium et 6 g de sulfate de magnésium, alors que le tampon citrate contient 1 g de citrate de sodium, 4 g de sulfate de magnésium, 1 g de chlorure de sodium et 0,5 g de citrate dissodique sesquihydrate.

Plusieurs phases dSPE ont été utilisées pour l'étape de purification : PSA, mélange PSA/C18 ou mélange PSA/C. Ces phases ont été obtenues par la société Macherey-Nagel (Hoerd, France). La phase florisil a, quant à elle, été obtenue auprès de l'entreprise SDS (Peypin, France).

3.2. Échantillons

Le développement et la validation de la méthode multirésidus ont été réalisés à partir de matrices blanches fournies par la FNOSAD (Fédération Nationale des Organisations Sanitaires Apicoles Départementales) et provenant de l'île d'Ouessant, zone protégée au large du Finistère. Ces matrices sont exemptes de toute contamination aux pesticides, leur usage étant interdit sur cette île.

Les différentes matrices ont été collectées dans des ruchers sélectionnés par la FNOSAD et différentes ADA (Associations de Développement de l'Apiculture). Au total, 125 échantillons d'abeilles, 87 échantillons de cire et 276 échantillons de pain d'abeille, sur la période 2012 - 2016 ont été prélevés et stockés au congélateur (-20 °C) jusqu'à leur analyse. La majorité des échantillons prélevés proviennent de ruches ayant présenté des troubles ou de fortes mortalités. Les prélèvements ont été réalisés juste après l'observation de ces troubles par les apiculteurs, selon des protocoles définis par l'ADARA (ADA Rhônealpine).

Les échantillons fournis par la FNOSAD ont été collectés dans des ruches de différentes régions françaises : Bretagne, Auvergne, Charente-Maritime, Rhône-Alpes, Bourgogne et PACA.

3.3. Prétraitement des échantillons de cire et de pain d'abeille

Les échantillons de pain et de cire d'abeille subissent, à réception, un prétraitement qui consiste à récupérer uniquement la matrice d'intérêt.

Le pain d'abeille est prélevé manuellement à l'aide de pinces à partir des cadres de ruches (Figure II-6).



a) Cadre de ruche contenant du pain d'abeille



b) Récupération du pain d'abeille à l'aide de pinces



c) Pain d'abeille

Figure II-6 Récupération du pain d'abeille

Quant à la cire d'abeille, un prototype a été fabriqué au sein du laboratoire avec l'aide de l'équipe « Prototypes, maintenance et métrologie ». Ce prototype, baptisé « WaxBox » (Figure II-7), permet la récupération de la cire par chauffage à 80 °C. Il est basé sur le principe des cérificateurs solaires qu'utilisent les apiculteurs pour récupérer la cire des cadres.

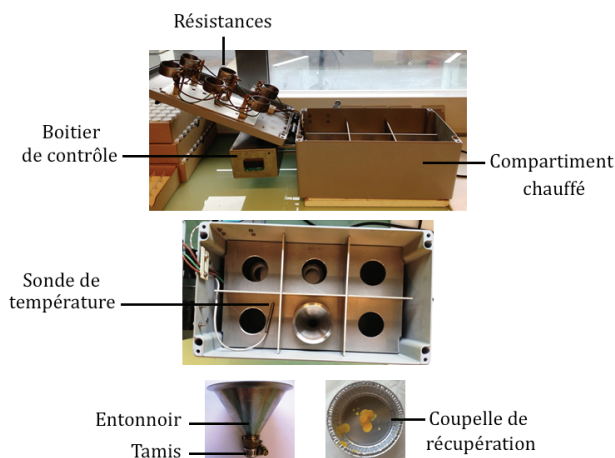


Figure II-7 Éléments constitutifs du prototype de récupération de la cire : la WaxBox

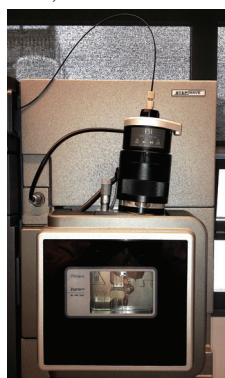
3.4. Analyse par UPLC-QqQ

Pour la séparation des pesticides de l'étude, le choix s'est porté sur la chromatographie liquide, qui permet d'avoir une seule et même séparation pour les trois familles de pesticides. Le système chromatographique en phase liquide utilisé est le système H-Class de chez Waters® couplé au détecteur triple quadrupôle Xevo TQ-S également de chez Waters® (Figure II-8).

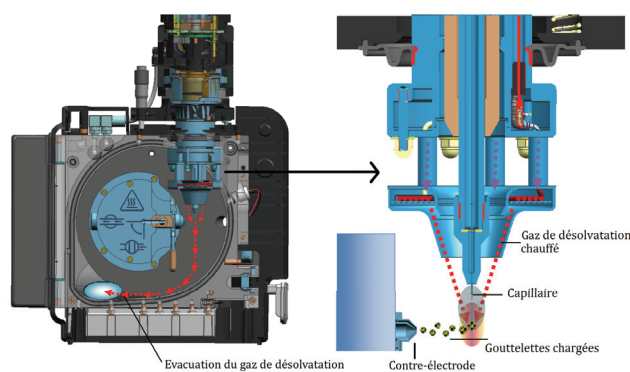


Figure II-8 Couplage H-Class UPLC et Xevo TQ-S (Waters®)

À l'issue de la séparation, les composés sont transférés vers le détecteur *via* une source d'ionisation de type électrospray (ESI), et plus particulièrement Z-spray (Figure II-9).



a) Source ESI Z-spray



b) Schéma de fonctionnement interne de la source ESI Z-spray

Figure II-9 Source ESI Z-spray du Xevo TQ-S (Waters®)

Le schéma Figure II-10 montre, quant à lui, les différents éléments constitutifs du détecteur TQ-S. Cet appareil est doté de la technologie StepWave™, pour l'étape de transfert des ions entre la source électrospray et le premier quadrupôle. Cette technologie, basée sur l'empilement d'anneaux qui guident les ions, permet de maximiser le

transfert des ions entre la source et l'analyseur, tout en éliminant les contaminants neutres. En effet, sa géométrie permet de diriger efficacement le nuage d'ions dans sa partie supérieure (flux jaune, Figure II-10), tout en éliminant l'important flux de gaz, l'excès de solvant et les espèces neutres (flux bleu, Figure II-10). Ceci permet de protéger la partie supérieure ainsi que toute la ligne de transfert suivante des contaminants, augmentant ainsi la robustesse de l'instrument même lorsqu'il s'agit de matrices complexes.

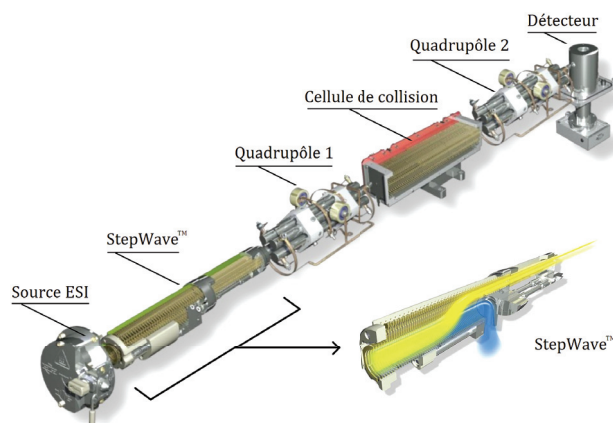


Figure II-10 Éléments constitutifs du détecteur TQ-S (Waters®)

L'optimisation automatique des paramètres de transfert des ions ainsi que le choix des transitions et des paramètres associés sont réalisés à l'aide du logiciel constructeur IntelliStart™.

3.5. Préparation d'échantillon

Cette partie résume les méthodes développées pour extraire les pesticides ciblés dans les échantillons d'abeilles, de pain d'abeille et de cire d'abeille. Les extractions des matrices abeilles et pain d'abeille ont été développées au sein de l'équipe TRACES avant le début de la thèse. Celle sur le pain d'abeille a fait l'objet d'une publications (96). L'optimisation de ces deux méthodes ne sera pas présentée dans ce manuscrit.

3.5.1. Les abeilles

La première étape consiste à ajouter dans un tube à centrifuger de 50 mL les abeilles (5 g) et les différents réactifs : 30 g de billes d'acier inoxydable (pour l'utilisation du Geno/Grinder®, (SPEX Sample Prep®, Metuchen, USA)), 3 mL d'eau, 3 mL d'heptane, 10 mL d'ACN à 2 % de TEA ainsi que 250 µL d'une solution d'étalons internes

à $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ (imidaclopride-d4 et permethrine-d6). Une agitation par vortex est réalisée pendant 10 sec, suivie de l'ajout du tampon citrate. Une forte agitation manuelle pendant 10 sec est effectuée afin d'éviter l'agglomération du sulfate de magnésium. Un broyage est ensuite réalisé à l'aide du Geno/Grinder® pendant 4 min à 1000 rpm. Puis une centrifugation à $5000 \times g$ pendant 2 min permet de séparer les phases solide et liquide. Un volume de 8 mL de surnageant (phase ACN) est alors prélevé puis congelé à -18°C pendant 12 heures minimum. Puis un prélèvement de 6 mL d'extrait est introduit dans un tube contenant la dSPE PSA/C18 suivi d'une agitation de 10 sec par vortex. Une centrifugation est ensuite réalisée à $5000 \times g$ pendant 2 min permettant le prélèvement d'un volume de 4 mL d'extrait. Celui-ci est évaporé complètement à 40°C sous flux d'azote. Une fois sec, le résidu est dissous dans $320 \mu\text{L}$ de MeOH. Un volume de $40 \mu\text{L}$ de cet extrait est prélevé puis introduit dans un vial dans lequel un volume de $160 \mu\text{L}$ d'eau est finalement ajouté avant l'analyse par UPLC-MS/MS.

3.5.2. Le pain d'abeille

La prise d'essai de pain d'abeille est de 2 g et se réalise dans un tube à centrifuger de 50 mL. De l'eau (5 mL), de l'heptane (5 mL) et de l'ACN (10 mL) contenant 2 % de TEA, sont ajoutés dans le tube. Un volume de $200 \mu\text{L}$ d'une solution d'étalons internes à $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ (imidaclopride-d4 et permethrine-d6) ainsi qu'un barreau en céramique (Agilent Technologies) sont ajoutés avant agitation du mélange par vortex pendant 15 sec. Le tampon acétate est alors ajouté dans le tube, qui est immédiatement agité manuellement pendant 10 sec afin d'éviter l'agglomération du sulfate de magnésium. Ensuite, une seconde agitation, de 20 sec, est réalisée par vortex dans le but d'homogénéiser l'échantillon. Après, le mélange subit une centrifugation à $5000 \times g$ pendant 2 min. Cela permet la récupération d'un volume de 8 mL de surnageant (phase ACN) qui est ensuite congelé à -18°C pendant 15 heures. Un volume de 6 mL de l'extrait est ensuite transféré dans un tube de dSPE contenant 150 mg de PSA et 900 mg de sulfate de magnésium, puis agité à l'aide d'un vortex pendant 10 sec. Une nouvelle étape de centrifugation est alors réalisée ($5000 \times g$, 2 min) qui permet de récupérer un volume de 4 mL d'extrait purifié. Puis l'extrait est évaporé à sec à 40°C sous flux d'azote. Enfin, le résidu sec est dissous dans un volume de $400 \mu\text{L}$ de MeOH. Pour finir, $40 \mu\text{L}$ de MeOH sont ajoutés à un volume de $160 \mu\text{L}$ d'eau avant l'analyse par UPLC-MS/MS (d'après (96)).

3.5.3. La cire d'abeille

La cire (0,5 g) est introduite dans un flacon de verre de type Wheaton dans lequel sont ajoutés un volume de 4 mL de pentane ainsi que 250 μL d'une solution contenant les étalons deutérés imidaclopride-d4 et permethrine-d6 à 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Ce flacon est ensuite placé sous agitation dans un bain à ultrasons jusqu'à dissolution complète de la cire. Ce mélange est ensuite déposé dans un tube contenant 2,4 g de terre de diatomée préalablement réduite en poudre à l'aide du Geno/Grinder®. Un rinçage du flacon est effectué à l'aide de 4 mL de pentane, qui sont ensuite ajoutés au reste du mélange dans le tube à centrifuger. Ce tube est agité manuellement et par vortex dans le but de répartir de façon homogène le mélange de cire dissoute dans la poudre de terre de diatomée. Puis le pentane est éliminé par évaporation sous un faible flux d'azote, à température ambiante. Le résidu sec, mélange de terre de diatomée et de cire qui s'est alors recristallisée, est agité par vortex afin de parfaire l'homogénéité du mélange.

Un volume de 15 mL d'ACN acidifié (0,1 % d'acide formique) est ajouté dans le tube à centrifuger puis de fortes agitations manuelles puis par vortex sont réalisées. Une étape de centrifugation, à 5000 x g pendant 2 min (5°C), permet par la suite de récupérer le surnageant, c'est-à-dire l'ACN contenant les composés extraits. Un volume de 10 mL d'ACN est alors récupéré et mis de côté. Cette étape d'extraction est répétée une seconde fois avec 15 mL d'ACN. À l'issue de cette nouvelle extraction et centrifugation, un volume de 15 mL est récupéré puis ajouté aux 10 mL précédents. Ce tube, contenant les 25 mL d'ACN issus de l'extraction, est stocké à une température de -18 °C pendant environ 15 heures.

Une centrifugation est alors réalisée à 5000 x g pendant 2 min (5°C) dans le but de regrouper tous les précipités de résidus de cire s'étant formés pendant les 15h. Ceci permet de prélever un volume de 10 mL d'ACN exempt de résidus de cire auxquels sont ajoutés 200 μL de DMSO. Après agitation par vortex (10 s), l'ACN est évaporé à 40 °C sous flux d'azote.

Une fois l'ACN évaporé, un volume de 1,8 mL d'un mélange eau/MeOH (80/20) est ajouté au DMSO. Après homogénéisation, 2 μL de ce mélange sont analysés par UPLC-MS/MS.

3.6.Séparation par chromatographie en phase liquide (UPLC)

La séparation par chromatographie en phase liquide a été réalisée sur une colonne Kinetex Phenyl-Hexyl (100 x 2,1 mm, 2,6 μm) de marque Phenomenex (Le Pecq, France). Les phases mobiles sont: (A) solution aqueuse à 0,01 % d'acide acétique et 0,04 mmol.L⁻¹ d'acétate d'ammonium et (B) MeOH. La méthode chromatographique a été réalisée en mode gradient (Tableau II-1). Le débit de phase mobile est fixé à 0,4 mL.min⁻¹, la température du four est de 60 °C et le volume d'injection est de 2 μL .

Tableau II-1 Gradient appliqué pour l'analyse LC des 13 pesticides

Temps (min)	Pourcentage de (A)	Pourcentage de (B)
0	95	5
7	10	90
9	0	100
12	95	5

3.7.Détection par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)

L'ionisation est effectuée grâce à une source electrospray (ESI) fonctionnant en mode positif et dont les paramètres optimaux sont : voltage du capillaire à 3200 V, température de désolvatation à 450 °C, température de source à 150 °C, débit de gaz de désolvatation (azote) à 900 L.h⁻¹ et débit de gaz de nébulisation (azote) à 150 L.h⁻¹.

Pour chaque composé, la sélection des paramètres optimaux de détection a été réalisée à l'aide du logiciel IntelliStartTM. Pour cela, chaque composé en solution à 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (MeOH) a été infusé.

À la suite de cette infusion, les deux transitions optimales pour chaque composé sont choisies. Ces transitions seront ensuite utilisées pour créer une méthode de détection par Multiple Reaction Monitoring (MRM) permettant de suivre plusieurs transitions en même temps. Pour les néonicotinoïdes et le boscalide, l'ion précurseur suivi pour la détection est sous forme $[\text{M}+\text{H}]^+$ alors que pour la famille des pyréthri-noïdes les ions précurseurs sont des adduits ammonium $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$. Le Tableau II-2 regroupe les différents paramètres optimums pour l'identification des composés étudiés.

Tableau II-2 Temps de rétention (t_R), transitions de quantification (MRM1) et de confirmation (MRM2) et paramètres de sources pour l'identification et la détection des 13 pesticides par UHPLC-MS/MS

Composé	t_R (min)	Transitions	Dwell time (s)	Tension de cône (V)	Energie de collision (eV)
Acide-6-chloronicotinique	1,75	MRM1 158 → 121	0,003	28	18
		MRM2 158 → 78		20	21
Thiaméthoxame	3,18	MRM1 292 → 221	0,003	22	12
		MRM2 292 → 181		22	24
Oléfine-imidaclopride	3,18	MRM1 254 → 171	0,003	18	18
		MRM2 254 → 205		18	18
5-hydroxy-imidaclopride	3,28	MRM1 272 → 191	0,003	16	16
		MRM2 272 → 225		16	14
Clothianidine	3,37	MRM1 250 → 169	0,003	20	12
		MRM2 250 → 132		20	14
Imidaclopride	3,74	MRM1 256 → 175	0,003	16	18
		MRM2 256 → 209		16	14
Acétamipride	4,04	MRM1 223 → 126	0,003	28	20
		MRM2 223 → 187		28	12
Thiaclopride	4,48	MRM1 253 → 126	0,003	20	20
		MRM2 253 → 186		20	12
Boscalide	6,46	MRM1 343 → 307	0,197	30	20
		MRM2 343 → 140		30	20
Lambda-cyhalothrine	8,16	MRM1 467 → 225	0,025	6	12
		MRM2 467 → 141		6	46
Cyperméthrine	8,22	MRM1 433 → 191	0,003	20	12
		MRM2 433 → 416		20	8
Deltaméthrine	8,28	MRM1 523 → 281	0,025	10	14
		MRM2 523 → 506		10	8
Bifenthrine	8,37	MRM1 440 → 181	0,003	32	14
		MRM2 440 → 166		32	44

3.8.Évaluation et validation de la méthode

La méthode développée a été validée par application de la Directive « International Conference Harmonisation » (ICH, 2005) (124). Les limites de détection et de quantification, la sélectivité, la précision, la linéarité ainsi que le rendement d'extraction de la méthode ont été évalués. La cire blanche a été analysée afin de vérifier qu'elle ne contenait pas les pesticides étudiés. La validation a été effectuée sur trois jours (Figure II-11).

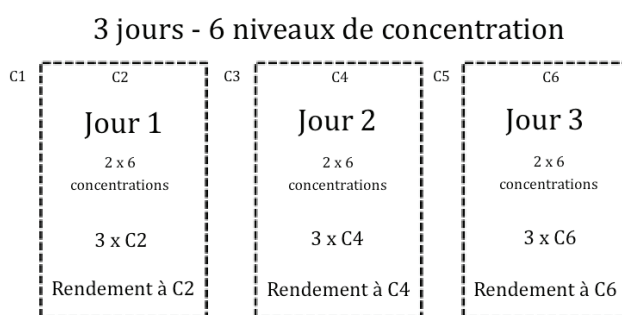


Figure II-11 Protocole de validation de la méthode d'analyse de la cire sur trois jours

Chaque jour, six échantillons de matrice blanche dopés avec l'ensemble des 13 analytes à six niveaux de concentration : C1 à C6 (Tableau II-3), ont été extraits puis analysés. L'ajout des pesticides dans la cire blanche s'est effectué en faisant fondre la cire à 80 °C et en ajoutant 200 µL de la solution de dopage, le tout sous agitation continue (barreau aimanté).

Le modèle mathématique qui convient le mieux à la courbe de calibration a été évalué en analysant les cires blanches dopées sur la gamme de concentration (C1 à C6), sur les trois jours, pour chaque composé.

La détermination de la précision intermédiaire (ou précision inter-jours) a été effectuée pour trois concentrations (C2, C4 et C6), en triplicat. La répétabilité (ou précision intra-jours) a été déterminée en effectuant deux extractions supplémentaires pour la concentration C2 le premier jour, C4 pour le second jour, et C6 le dernier jour. La précision intermédiaire et la répétabilité sont exprimées comme déviation standard relative (RSD, %) pour la série des trois mesures des différentes concentrations.

Le rendement a été déterminé aux niveaux de concentrations C2, C4 et C6, en analysant la cire blanche dopée aux différentes concentrations et en comparant les aires

obtenues à celles des extraits (issus de l'extraction de la cire blanche non dopée) dopés après la préparation d'échantillon.

En ce qui concerne l'analyse UPLC-MS/MS, les effets matrice (EM) ont été évalués en comparant les aires des pics des solutions standards préparées dans un mélange eau/méthanol (80/20), avec celles obtenues pour les cires blanches extraites puis dopées aux concentrations C2, C4 et C6.

Tableau II-3 Concentrations de la courbe de calibration (ng/g)

	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Boscalide						
Thiaclopride						
Acétamipride	1	2	5	10	20	50
Imidaclopride						
Clothianidine						
Thiaméthoxame						
Deltaméthrine	5	10	25	50	100	250
5-hydroxy-imidaclopride						
Bifenthrine						
Cyperméthrine	10	20	50	100	200	500
Oléfine-imidaclopride						
Acide-6-chloronicotinique	20	40	100	200	400	1000
Lambda-cyhalothrine						

3.9. Traitement des données et quantification

En ce qui concerne la procédure de quantification, une calibration de type « matrix-matched » est réalisée à partir de la matrice blanche, avec six points (C1 à C6). De plus, les composés deutérés imidaclopride-d4 et cyperméthrine-d6 sont utilisés pour contrôler l'efficacité de l'extraction. Le logiciel MassLynx 4.1 (Waters®) est utilisé pour traiter les données. Lorsque la concentration dans l'échantillon est supérieure à celle du point C6, alors une dilution est effectuée avec un mélange eau/MeOH (80 : 20) et la quantification est réalisée avec une calibration dans le solvant, puisque les effets matrice deviennent négligeables.

4. Résultats et discussions

Le développement de la méthode a principalement été basé sur l'optimisation de la préparation d'échantillon en vue de l'analyse par UPLC-MS/MS. Cette étape a représenté un défi puisque l'enjeu était de parvenir à extraire de la cire 13 pesticides appartenant à trois classes de pesticides, dont les propriétés physico-chimiques sont très différentes. En effet, par exemple, les pyréthriinoïdes sont lipophiles, les néonicotinoïdes sont hydrophiles et le boscalide est moyennement hydrophile. De plus, l'extraction devait permettre d'atteindre les objectifs en termes de robustesse et de limite de détection de l'ordre du ng.g^{-1} .

Le développement de la méthode a fait l'objet d'une publication (126).

4.1.Extraction de la cire d'abeille

Le but était de développer un protocole d'extraction le plus simple possible permettant d'obtenir des rendements satisfaisants pour tous les analytes. Pour cela, plusieurs méthodes ont été développées et évaluées : une LLE, une SPE avec des cartouches de terre de diatomée, et une extraction sur support solide dispersif (terre de diatomée utilisée en mode dispersif).

4.1.1.Développement et optimisation de l'extraction

Extraction Liquide-Liquide (LLE)

Les premières expériences d'extraction de la cire ont été réalisées par la méthode LLE. Pour cela, plusieurs solvant seuls (chloroforme, ACN, dichlorométhane, heptane, MeOH, acétone, toluène, acétate d'éthyle) ou mélanges de solvants (heptane/toluène, heptane/éthanol, heptane/acétate d'éthyle, heptane/acétone, toluène/éthanol, toluène/acétate d'éthyle, toluène/acétone, toluène/MeOH, toluène/ACN, éthanol/MeOH, dichlorométhane/acétone, dichlorométhane/MeOH, chloroforme/ACN, éthanol/acétone, éthanol/ACN, acétate d'éthyle/ACN) (50:50, v/v) ont été évalués.

Ces tests ont été réalisés avec 2 mL de solvant ou mélange de solvants pour 0,5 g de cire dopée à 100 ng.g^{-1} avec le mélange de 12 pesticides cibles (le boscalide n'ayant été ajouté qu'après à la liste des pesticides d'intérêt). L'ajout du solvant est suivi d'une agitation par vortex (2 min) et aux ultrasons (40 min). Puis une étape de congélation ($-18 \text{ }^\circ\text{C}$, 3 h) est menée dans le but de solidifier la cire et ainsi faciliter l'étape de centrifugation. L'extrait est donc ensuite centrifugé (5 000 rpm, 2 min) et la phase orga-

nique récupérée. Une nouvelle extraction est réalisée avec 2 mL de solvant, puis les extraits sont regroupés. L'extrait global final est congelé (- 18 °C, 3 h) puis à nouveau centrifugé (5 000 rpm, 2 min), et la phase organique récupérée. Un volume de 2 mL de cet extrait est prélevé et évaporé (40 °C) sous flux d'azote. Le résidu est ensuite reconstitué dans 1 mL d'heptane et 2 mL d'un mélange eau/MeOH (80:20, v/v). L'heptane permet la re-dissolution des résidus collés aux parois du tube au cours de l'étape d'évaporation sous azote, permettant un meilleur contact entre les résidus contenant les analytes et la phase eau/MeOH. Ensuite, une agitation par vortex puis une centrifugation (5 000 rpm, 2 min) sont réalisées. La phase eau/MeOH est récupérée et injectée en UPLC-MS/MS.

Afin de faire une première estimation de l'efficacité des solvants, les aires des pics obtenus ont été comparées (solvants seuls : Figure II - 12 et mélanges de solvants : Figure II - 13). Globalement, l'utilisation des solvants seuls mène à une extraction moins efficace (aires plus faibles) par rapport à l'utilisation de mélanges de solvants.

Les deux mélanges de solvants conduisant à l'extraction la plus efficace (aires les plus grandes) sont les mélanges chloroforme/ACN et acétate d'éthyle/ACN. Des analyses supplémentaires ont été réalisées afin d'évaluer les rendements d'extraction. Ces derniers sont compris entre 30 et 49 % avec le mélange chloroforme/ACN, et 10 et 17 % avec le mélange acétate d'éthyle/ACN.

Afin d'améliorer ces résultats, des extractions successives (1, 2, 3, 4 et 5) ont été réalisées. Malgré des améliorations, cela n'a pas été suffisant pour atteindre des rendements de 70 %, qui représentaient l'objectif visé.

De la même manière, l'effet de la durée de l'agitation par bain à ultrasons a été étudiée (0, 2, 5, 10, 20 et 40 min). Cette agitation permet d'augmenter les extractions de toutes les molécules, à l'exception de la deltaméthrine (Figure II-14), avec le mélange acétate d'éthyle/ACN. Mais de la même manière que pour les extractions successives, les améliorations produites ne sont pas suffisantes pour atteindre des rendements de 70 %.

En conclusion, la LLE ne permet pas d'obtenir des résultats satisfaisants en termes d'efficacité et n'a, par conséquent, pas été approfondie.

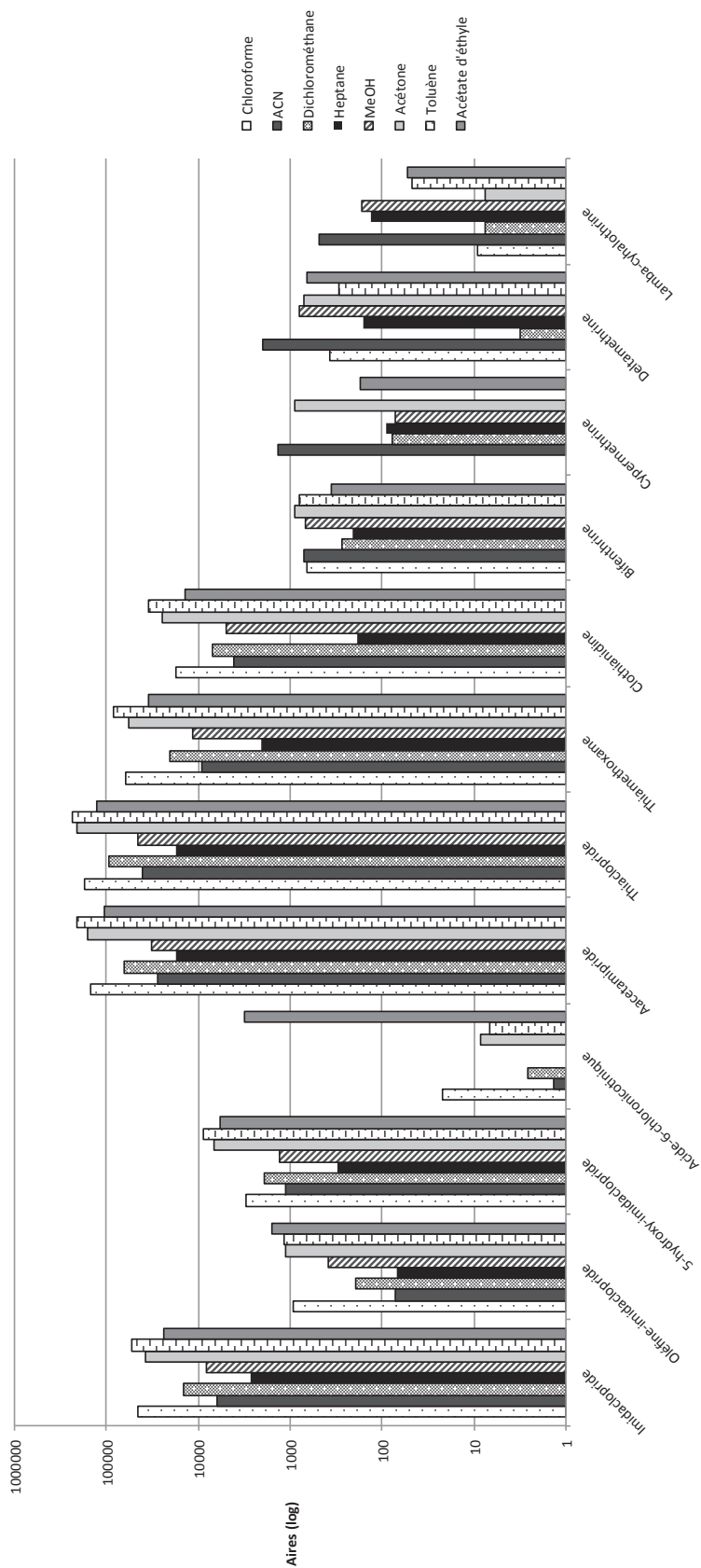
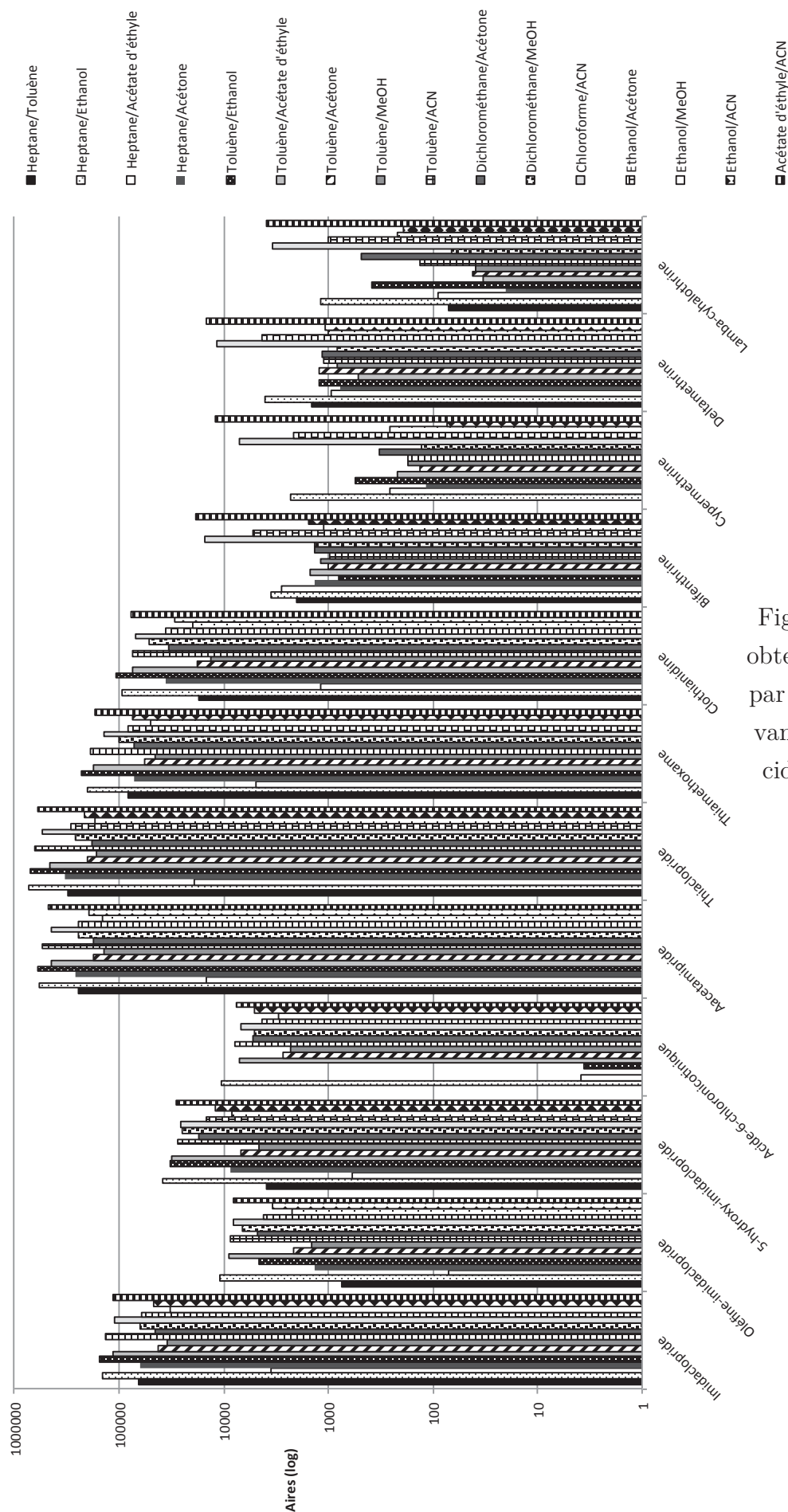


Figure II-12 Aires obtenues après LLE par solvants seuls des 12 pesticides dans la cire



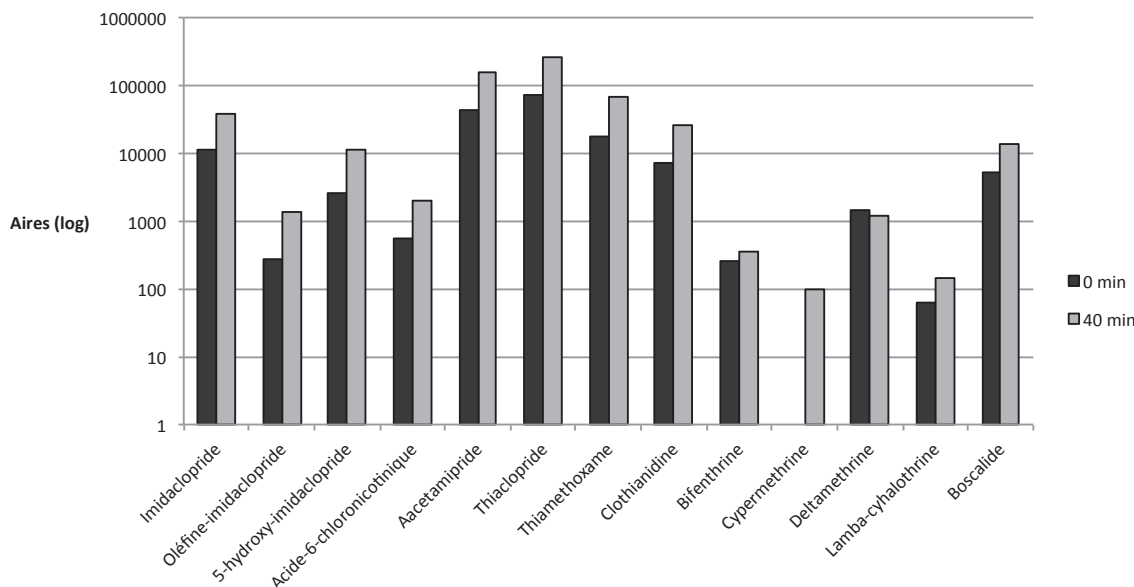


Figure II-14 Influence du temps d'agitation par ultrasons (0 et 40 min) sur les aires obtenues après l'LLE des 12 pesticides dans la cire par le mélange acétate d'éthyle/ACN

Extraction sur Phase Solide (SPE)

Une seconde technique d'extraction a été testée, utilisant un support solide : une cartouche EXtrelut[®], remplie de terre de diatomée.

Le protocole utilisé pour le développement a consisté à dissoudre 0,5 g de cire dopée à 100 ng.g⁻¹ avec les 13 pesticides cibles (le boscalide ayant été ajouté), dans 20 mL de pentane, suivi d'une agitation par vortex et par ultrasons pendant 1 h. Le pentane permet la dissolution de la cire. L'utilisation de ce solvant permet également de diminuer le temps d'évaporation avant l'étape d'élution, en comparaison avec d'autres solvants tels que l'hexane.

La cire dissoute dans le pentane est déposée en tête de la cartouche de terre de diatomée. La percolation est effectuée par gravité, en 20 min. Puis, l'élution est réalisée par l'ajout successif de 10 volumes de 10 mL d'acétonitrile. Le volume final récupéré est ensuite évaporé au rotavapor (Büchi[®] - Rungis, France), à 40 °C. Le résidu est ensuite reconstitué avec 2 mL d'un mélange eau/MeOH (80/20) puis injecté dans le système UPLC-MS/MS.

Ce premier test a permis d'obtenir des rendements satisfaisants (entre 85 et 136 %) pour toutes les molécules sauf l'acide-6-chloronicotinique (10 %) (Figure II-15). Le choix du solvant a alors été étudié afin d'optimiser ces premiers résultats.

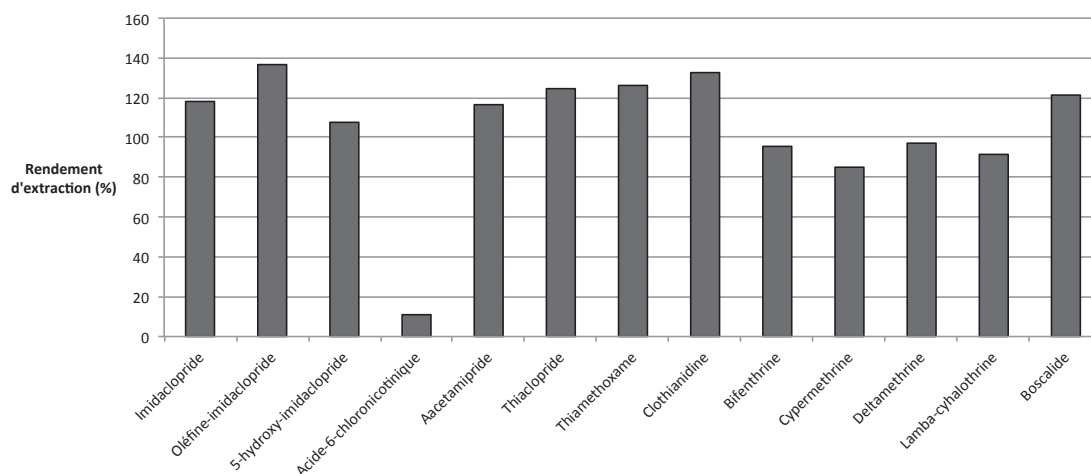


Figure II-15 Rendements d'extraction (%) des 13 pesticides dans la cire obtenus par SPE avec une cartouche EXTrelut®

Afin de choisir le solvant d'élution, l'ACN, le MeOH, ainsi qu'un mélange ACN/MeOH, ont été évalués et comparés (Figure II-16). Pour la famille des néonicotinoïdes et pour le boscalide, aucune différence significative n'a été observée. Au contraire, pour la famille des pyréthrinoïdes, les résultats montrent clairement que l'ACN permet d'obtenir des aires plus importantes. Par conséquent, l'ACN a été retenu afin d'effectuer l'élution, donc l'extraction.

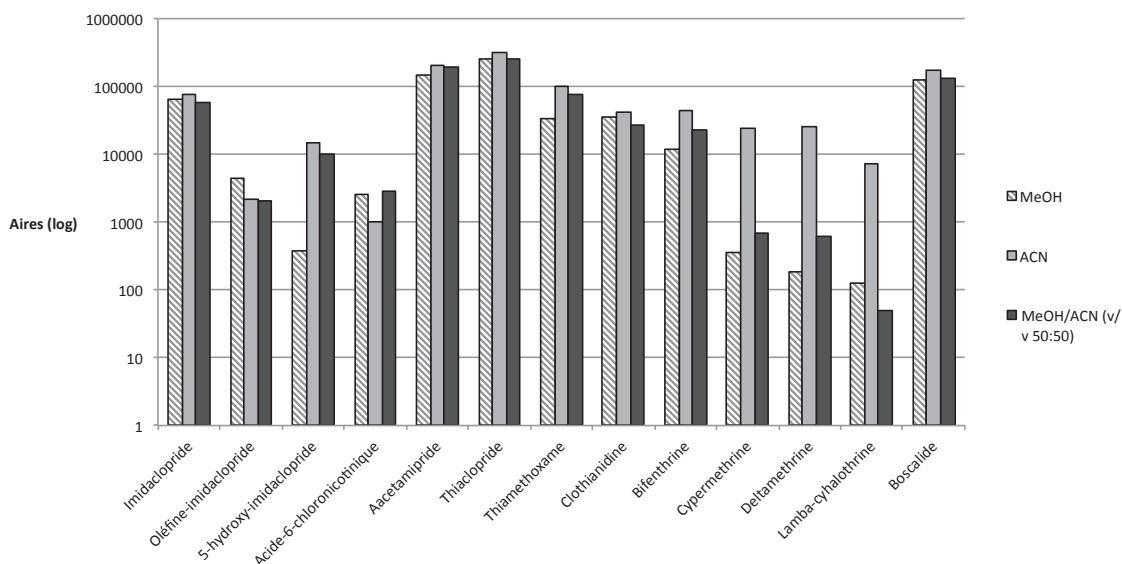


Figure II-16 Extraction par cartouche EXTrelut® - Influence du solvant d'extraction sur les aires des 13 pesticides

Une étape supplémentaire de purification a été évaluée par dSPE. Plusieurs phases ont été testées : PSA, PSA/C18 et PSA/C18/C. Après agitation par vortex et centrifugation (5000 rpm, 2 min), 7 mL de l'extrait purifié sont récupérés et évaporés sous flux d'azote (40 °C). Le résidu est ensuite reconstitué avec 2 mL d'un mélange eau/MeOH (80/20) puis injecté dans le système UPLC-MS/MS. Les résultats (Figure II-17) ont montré que cette étape de purification semble ne pas être efficace ou nécessaire puisque le signal des substances cibles n'est pas être amélioré.

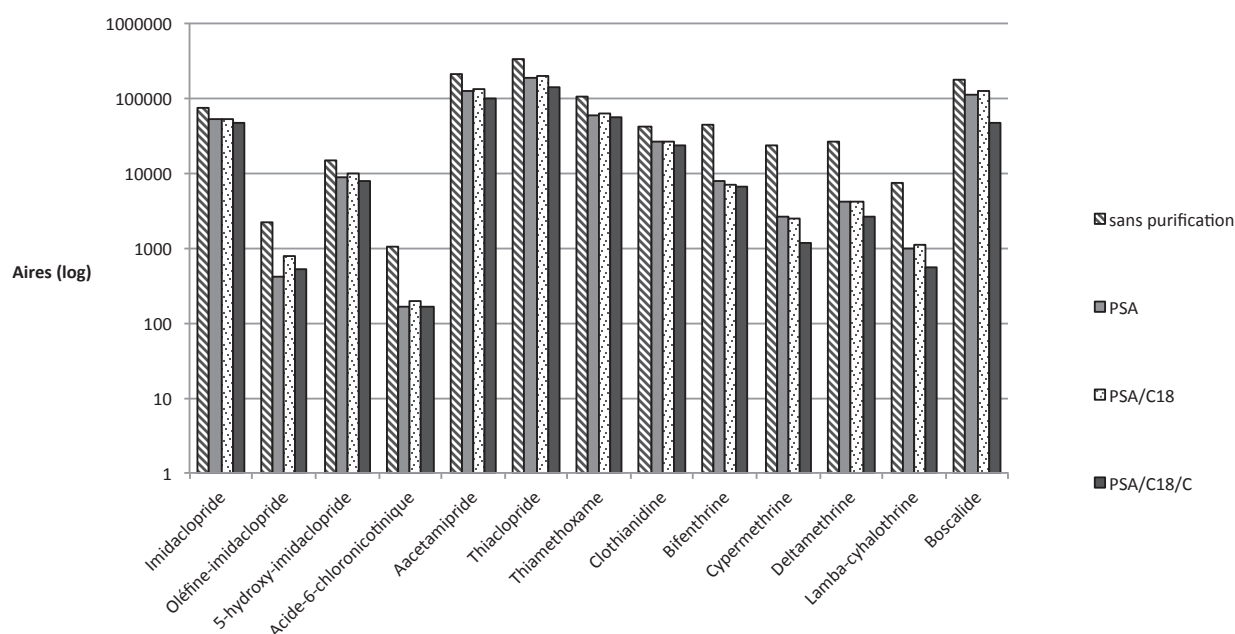


Figure II-17 Extraction par cartouche EXtrelut® - Influence d'une étape de purification sur les aires des 13 pesticides

En conclusion, cette technique d'extraction permet l'obtention de résultats satisfaisants en terme de performance lorsque l'ACN est utilisé comme solvant d'élution sans étape de purification. Cependant, cette méthode implique l'utilisation d'une grande quantité de solvant (120 mL), de temps (temps d'élution 50 min) et est relativement couteuse (coût d'une cartouche environ 24 €). Une optimisation de cette technique a alors été envisagée.

Extraction sur Phase Solide Dispersive (dSPE)

Une méthode dérivée de la précédente a été évaluée : dSPE à base de terre de diatomée. Dans le cadre de l'optimisation de cette technique, plusieurs paramètres ont été

testés à partir de 0,5 g de cire blanche dopée à 100 ng.g⁻¹ avec une solution contenant les 13 pesticides ciblés.

En raison de la complexité de la matrice cire, de nombreux composés interférents doivent être éliminés au cours de l'étape de préparation d'échantillon dans le but d'éviter les effets de matrice qui peuvent perturber le signal. Pour cette raison, les étapes d'optimisation de cette technique d'extraction ont pris en compte non seulement les rendements mais également les effets de matrice.

Plusieurs paramètres ont été optimisés :

- Taille des particules et quantité de terre de diatomée
- Volume du solvant d'extraction
- Addition d'acide formique au solvant d'extraction
- Addition de DMSO avant l'étape d'évaporation

Taille des particules et quantité de terre de diatomée

Afin d'homogénéiser la taille des particules et aussi augmenter la surface d'échange avec le solvant, la terre de diatomée a été réduite en poudre à l'aide du Geno/Grinder® (1000 rpm, 2 x 4 min). L'extraction a été réalisée avec 4 g de terre de diatomée et 50 mL d'ACN. L'effet de la taille des particules sur les rendements et les effets de matrice a ensuite été évalué (Figure II-18).

Le broyage de la terre de diatomée permet d'obtenir de meilleurs rendements pour 11 composés sur 13. Cette amélioration est très intéressante notamment pour la famille des pyréthrinoïdes et pour le boscalide, avec une augmentation de rendement comprise entre 25 et 50%. Au contraire, les effets de matrice ne semblent pas présenter de différence entre les deux types d'extraction : avec et sans broyage de la terre de diatomée.

Il est à noter que l'utilisation de terre de diatomée broyée permet une meilleure séparation entre le solvant et la phase solide lors de l'étape de centrifugation, ce qui améliore la praticité de la méthode.

La quantité de terre de diatomée utilisée dépend de la quantité de cire à traiter. Cette dernière est dépendante de l'échantillon brut fourni par les apiculteurs, qui peut contenir plus ou moins de cire. De plus, lorsque l'analyse est effectuée par spectrométrie de masse avec une source ESI, plus la quantité de matrice analysée est importante et plus les effets de matrice sont élevés. Par ailleurs, en ce qui concerne la quantité de matrice analysée, plus elle est élevée et plus les volumes de solvants et les quantités de matériaux d'extraction utilisés sont grands. Pour ces raisons il n'est pas possible d'augmenter la quantité de cire à extraire.

Finalement, un compromis a été trouvé, permettant d'obtenir des rendements équivalents à ceux présentés précédemment (Figure II-15), en utilisant 0,5 g de cire et 2,4 g de terre de diatomée. Ceci permet d'une part aux apiculteurs de ne pas trop endommager leurs ruches tout en assurant de récupérer une quantité suffisante de cire quel que soit l'échantillon, et d'autre part d'utiliser une quantité raisonnable de solvant et de terre de diatomée.

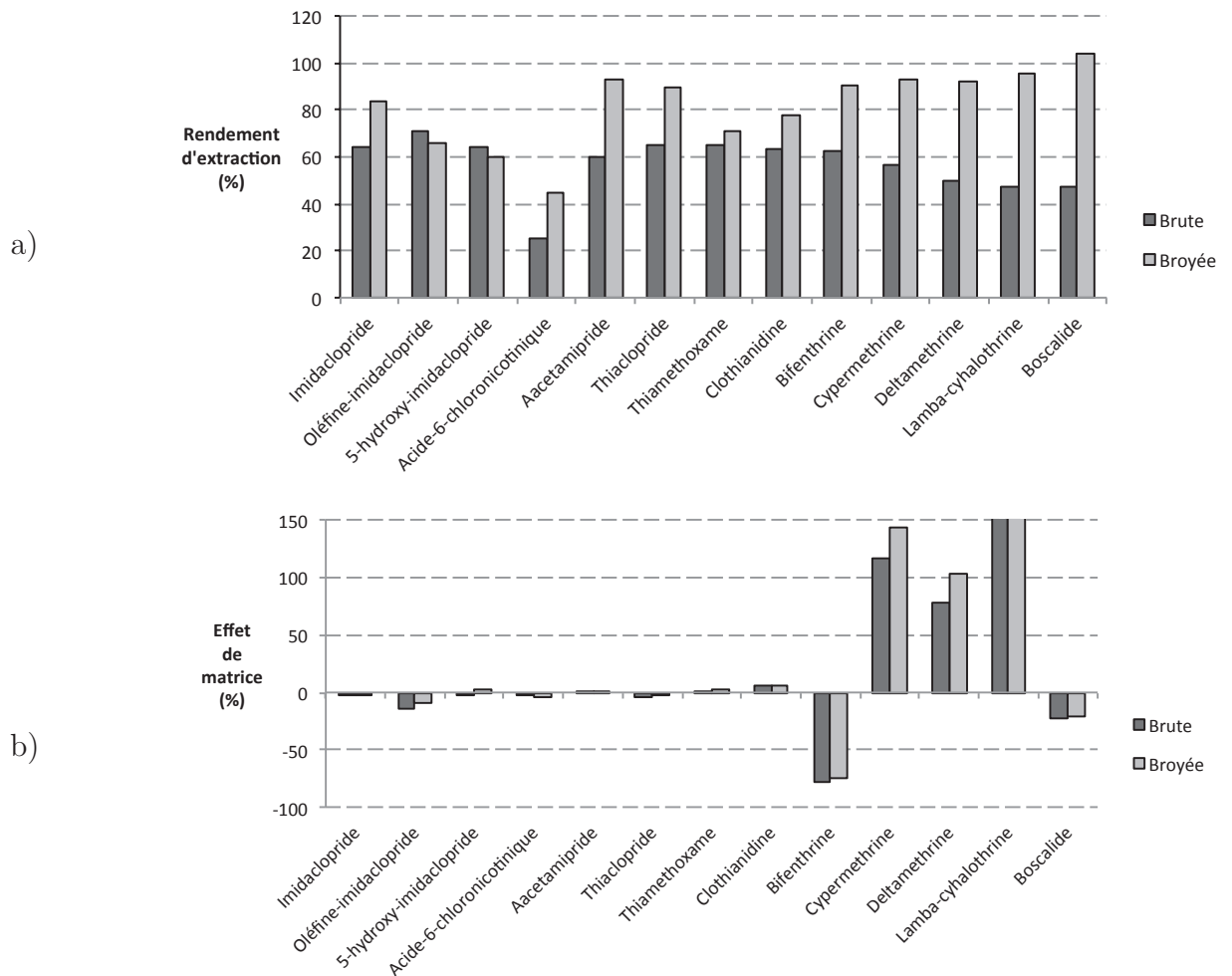


Figure II-18 Extraction dSPE à base de terre de diatomée: influence du broyage sur (a) les rendements et (b) les effets de matrice

Volume du solvant d'extraction

La méthode étant basée sur les principes et les résultats obtenus précédemment avec les cartouches EXTrelut[®], le solvant d'extraction choisi est donc l'ACN dont le volume (20, 30 ou 50 mL) a été optimisé (Figure II-19). Les rendements d'extraction sont supérieurs pour tous les composés lorsque l'extraction est effectuée avec 30 mL d'ACN. L'augmentation des rendements est comprise entre 10 et 50 %, entre 20 et 30 mL. Un volume de 30 mL est alors retenu pour l'extraction puisqu'il conduit à des rendements satisfaisants compris entre 60 et 100 %, sauf pour l'acide-6-chloronicotinique qui est extrait avec un rendement de 40 %.

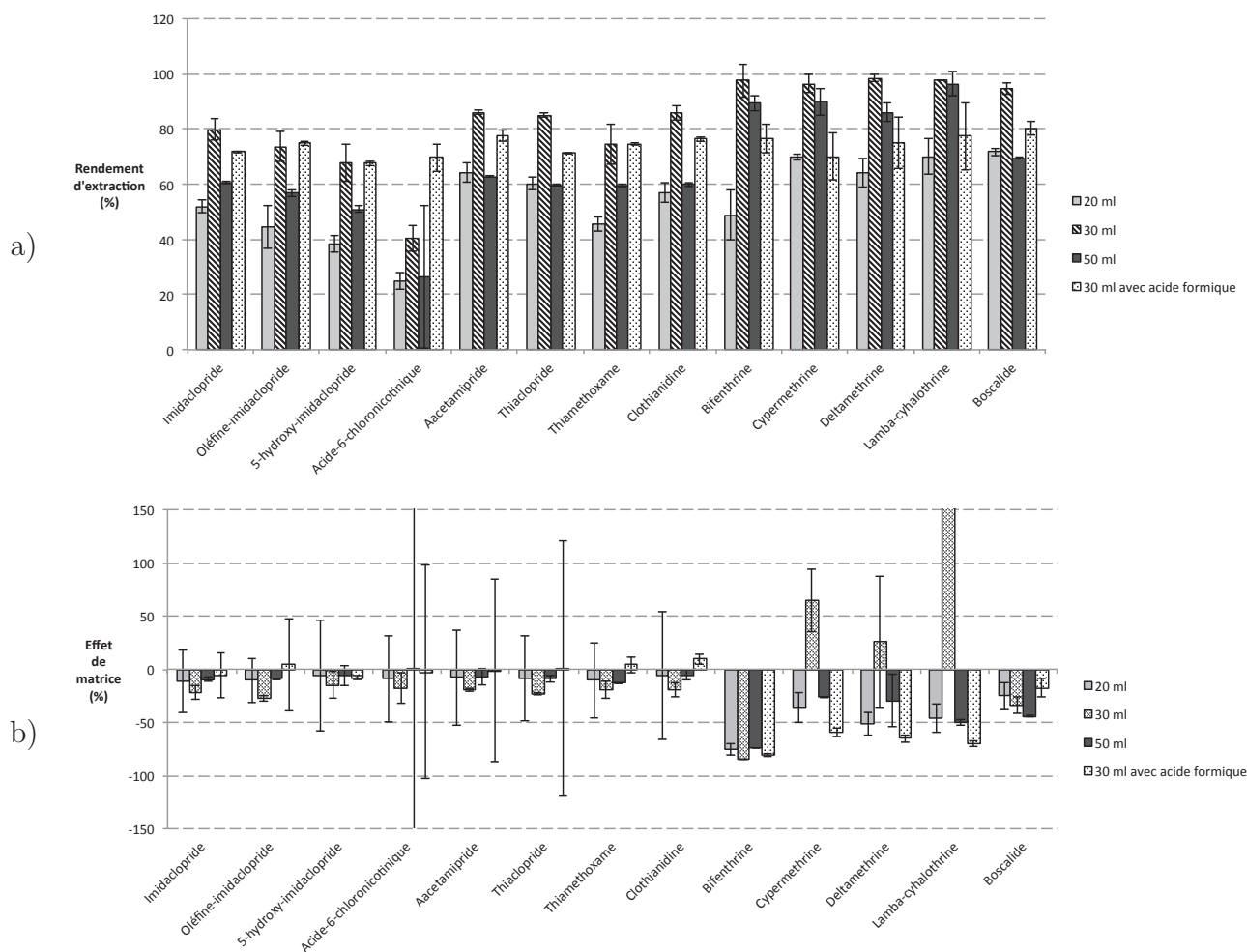


Figure II-19 Extraction dSPE : influence du volume de solvant d'extraction et de la présence d'acide formique sur les (a) rendements d'extraction et (b) effets de matrice

Afin d'améliorer le rendement d'extraction de l'acide-6-chloronicotinique, l'ajout d'acide formique au solvant d'extraction (0,1 %) a été testé (Figure II-19). Ceci a pour objectif de maintenir le composé dans sa forme neutre tout au long du processus d'extraction.

Globalement, une légère diminution des rendements d'extraction est observée pour tous les composés, sauf pour l'acide-6-chloronicotinique dont le rendement d'extraction est passé d'environ 40 % à 70 %. Finalement, l'extraction est réalisée avec de l'ACN acidifié avec 0,1 % d'acide formique.

En ce qui concerne les effets de matrice, il n'y a pas de différences significatives entre les 3 volumes testés.

Il est à noter que le volume utilisé ici (30 mL) est relativement faible comparé à ceux utilisés dans d'autres études sur la cire (95,102,127,128) ce qui conduit à une méthode à la fois plus économique et plus écologique.

Addition de DMSO avant l'étape d'évaporation

Lors de tests préliminaires, la perte de plusieurs composés avait été observée au cours de l'évaporation sous flux d'azote, et les rendements étaient alors descendus entre 14 et 80 %. En effet, lors de cette étape les composés matriciels résiduels se collent aux parois et, ces composés étant fortement lipidiques, le mélange eau/MeOH utilisé pour effectuer la reprise de ce résidu avant injection n'est pas efficace. Il en résulte donc une perte de certains composés, notamment les pyréthriinoïdes.

Pour pallier ces pertes, l'ajout de DMSO dans l'ACN, avant l'évaporation, a été testé. En effet, le DMSO est un solvant de très faible volatilité, dont la température d'ébullition est de 189 °C contre 82 °C pour l'ACN. Son ajout permet donc d'évaporer la totalité de l'ACN tout en évitant de perdre les composés matriciels qui renferment encore une partie des composés d'intérêts. De plus, le DMSO étant également un solvant aprotique, il est capable de dissoudre à la fois les composés lipophiles et les composés hydrophiles. Trois pourcentages de DMSO ont été évalués : 10, 20 et 50 % (Figure II-20).

Les résultats montrent que, mis à part le boscalide et l'acide-6-chloronicotinique pour lesquels l'ajout de DMSO ne semble pas avoir d'effet, tous les autres composés présentent une augmentation de leurs rendements d'extraction avec l'ajout de DMSO. Les meilleurs rendements sont obtenus avec une proportion de 10 % de DMSO. Ceci est particulièrement vrai pour les pyréthriinoïdes. Cependant, les effets de matrice correspondants sont bien plus importants pour un ajout de 10 % de DMSO que pour

un ajout de 20 ou 50 %. Un compromis a donc été décidé en choisissant d'ajouter une proportion de 20 % de DMSO dans l'ACN avant l'étape d'évaporation, soit 200 μ L pour un volume total de reprise de 2 mL.

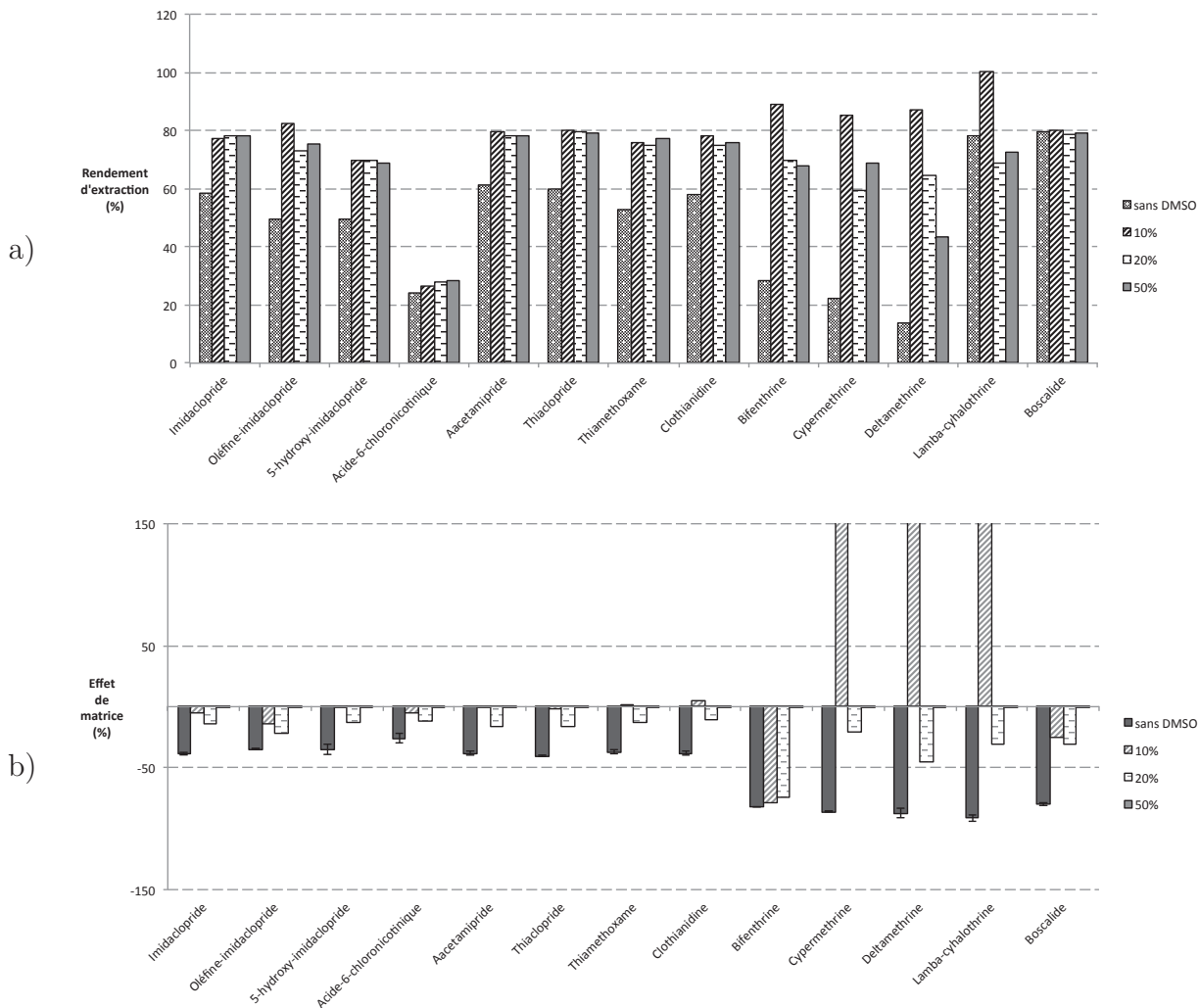


Figure II-20 Extraction dSPE : influence de la présence de DMSO au cours de l'évaporation sur les (a) rendements et (b) effets de matrice

4.1.2. Évaluation des performances et validation de la méthode

Pour faciliter la lecture, l'ensemble des résultats est présenté dans un tableau récapitulatif (Tableau II-4).

Sélectivité et spécificité des méthodes d'analyse

Les trois points d'identification ont été contrôlés pour chacun des composés étudiés afin d'assurer la sélectivité et la spécificité de la méthode.

Estimations des limites de détection et quantification

Les LOD et LOQ ont été déterminées par l'analyse d'extraits de cire blanche dopée à des concentrations croissantes.

La méthode développée présente des LOD et LOQ comprises entre 1 et 40 ng.g⁻¹. Pour les néonicotinoïdes les LOQ sont comprises entre 1 ng.g⁻¹ (thiaméthoxame, clothianidine, imidaclopride, acétamipride et thiaclopride) et 20 ng.g⁻¹ (acide-6-chloronicotinique). Les pyréthri-noïdes présentent, quant à eux, des LOQ comprises entre 5 ng.g⁻¹ (deltaméthrine) et 40 ng.g⁻¹ (lambda-cyhalothrine) et le boscalide de 1 ng.g⁻¹.

Des valeurs du même ordre de grandeur ont été reportées dans la littérature (entre 2 et 7 ng.g⁻¹) (95), pour l'analyse de 7 néonicotinoïdes dans la cire d'abeille après une extraction sur colonne EXTrelut®.

L'étude de Niell *et al.* (93), traitant de l'analyse de 51 pesticides dans la cire d'abeille, présente des LOQ plus élevées que celles obtenues pour la méthode développée : 100 ng.g⁻¹ pour le boscalide et la lambda-cyhalothrine, 10 ng.g⁻¹ pour le thiaméthoxame, l'imidaclopride et le thiaclopride.

Une autre étude portant sur l'analyse de néonicotinoïdes et de leurs métabolites (imidaclopride, 5-hydroxy-imidaclopride, acide-6-chloronicotinique, oléfine-imidaclopride, thiaméthoxame et clothianidine) dans les abeilles, le pollen et le miel (129), présente des LOQ comprises entre 43 et 132 ng.g⁻¹. Là encore, la méthode développée et présentée dans ce manuscrit permet d'obtenir de meilleurs résultats bien qu'elle soit une méthode multi-famille comprenant non seulement la famille des néonicotinoïdes mais également les pyréthri-noïdes et le boscalide qui ont des propriétés physico-chimiques bien différentes. En ce qui concerne les pyréthri-noïdes, l'étude multi-résidus de Chauzat *et al.* (29), qui utilise une quantité de solvant supérieure avec 84 mL (rap-

port $V/Q = 42 \text{ mL.g}^{-1}$), permet d'obtenir des LOQ de 10 ng.g^{-1} pour la cyperméthrine et 20 ng.g^{-1} pour la deltaméthrine, qui sont des valeurs équivalentes voire supérieures à celles obtenues avec la méthode développée (10 ng.g^{-1} et 5 ng.g^{-1} respectivement).

Bien que le boscalide ait rarement été reporté dans les études portant sur l'analyse des matrices apicoles, une étude globale portant sur la contamination de plusieurs matrices apicoles dont la cire d'abeille (84), reporte l'analyse du boscalide. Cette étude ne détaille pas les caractéristiques des méthodes analytiques utilisées. Cependant les LOD sont mentionnées pour le boscalide (1 ng.g^{-1}), la deltaméthrine (20 ng.g^{-1}), le thiaclopride (1 ng.g^{-1}) et l'imidaclopride (2 ng.g^{-1}). Ces valeurs sont similaires ou supérieures à celles obtenues pour la méthode développée (respectivement 1 ; 5 ; 1 et 1 ng.g^{-1}). La méthode présentée dans ce manuscrit est donc plus sensible pour les composés cités précédemment. Cependant, il faut noter qu'elle ne comprend pas autant de molécules à analyser (13 au lieu de 200). Une autre étude, traitant de l'analyse multi-résidus d'une centaine de composés dans les abeilles, le miel et le pollen (22), présentent des LOQ similaires pour deux composés communs : acétamipride ($1,1 \text{ ng.g}^{-1}$) et lambda-cyhalothrine (41 ng.g^{-1}). Cependant, la méthode développée permet d'obtenir des LOQ plus basses pour le boscalide (1 ng.g^{-1}) et la bifenthrine (10 ng.g^{-1}) par rapport à celles de Kasiotis *et al.* (22) (respectivement 12 ng.g^{-1} et 24 ng.g^{-1}). En revanche, ils obtiennent de meilleures LOQ pour le thiaclopride ($0,4 \text{ ng.g}^{-1}$ contre 1 ng.g^{-1}).

Même si plusieurs études parviennent à accéder à des performances similaires pour certains composés, la matrice d'étude n'est pas toujours la même. La cire étudiée dans ce manuscrit est bien plus complexe que les abeilles, le miel ou le pollen.

Globalement, la méthode développée est plus sensible que celles disponibles dans la littérature, en utilisant une quantité moindre de solvant. Le défi a concerné plus particulièrement la préparation d'échantillon. C'est finalement la combinaison d'une méthode d'extraction efficace à une méthode analytique sensible et sélective, basée sur la performance d'un système UPLC-MS/MS, qui a permis d'obtenir des LOQ basses pour tous les composés.

Estimation du modèle mathématique de la courbe de calibration

La correspondance du modèle mathématique des courbes de calibration est estimée pour chaque molécule avec le coefficient de détermination (r^2). Ainsi, les courbes de calibration des néonicotinoïdes et du boscalide correspondent à des modèles linéaires, alors que celles des pyréthri-noïdes correspondent à un modèle quadratique. Les coeffi-

cients de détermination sont tous supérieurs à 0,99, excepté pour la lambda-cyhalothrine et la deltaméthrine (0,98) et pour la cyperméthrine (0,95).

Précision intermédiaire et répétabilité

Les valeurs des coefficients de variation (CV) de la répétabilité indiquent une répétabilité satisfaisante (< 20 %) pour la majorité des molécules. Cependant, les pyréthri-noïdes présentent des CV plus élevés (entre 26% pour la deltaméthrine et 58% pour la cyperméthrine) à la concentration basse (C2).

En ce qui concerne la précision intermédiaire, les résultats montrent l'effet inverse. Les valeurs sont satisfaisantes (< 30 %) pour les pyréthri-noïdes, le boscalide, le thiaclopride et l'acétamipride. En revanche, les six autres molécules présentent des valeurs supérieures, notamment sur les concentrations basses (C2) et moyennes (C4), comprises entre 30 % (clothianidine, C2) et 45 % (oléfine-imidaclopride, C2).

Rendements d'extraction

Les rendements d'extraction obtenus sont satisfaisants puisqu'ils sont compris entre 72 % (oléfine-imidaclopride, C6 ; bifenthrine, C2) et 116 % (cyperméthrine, C2).

Effets de matrice

Une suppression de signal est observée pour tous les pesticides, excepté pour la deltaméthrine (17 %, C2). Les effets de matrice sont faibles pour la famille des néonicotinoïdes, puisque compris entre -2 % (5-hydroxy-imidaclopride, C4 ; imidaclopride, C2) et -12 % (oléfine-imidaclopride, C6 ; acide-6-chloronicotinique, C2), sauf pour l'oléfine-imidaclopride C2 (-22%). Le boscalide présente des effets de matrices compris entre -16% (C2) et -38% (C6). En revanche, les pyréthri-noïdes présentent des effets de matrice plus importants, compris entre -20% (cyperméthrine, C2) ou 17% (deltaméthrine) et -92% (bifenthrine, C6).

Des effets de matrice sont donc observés pour les pyréthri-noïdes et, dans une moindre mesure, pour le boscalide. Cependant, des effets de matrice compris entre 61 et 79 % ont été reportés dans une étude qui traite de l'analyse de sept néonicotinoïdes (dont acétamipride, clothianidine, imidaclopride, thiaclopride et thiaméthoxame) dans la cire d'abeille (95). En revanche, l'étude de Niell *et al.* (93), traitant de l'analyse de 51 pesticides dans la cire d'abeille, fait état d'effets de matrice moins importants pour deux molécules : 5% pour le boscalide et -23 % pour la lambda-cyhalothrine.

L'étude de *Li et al.* (85) présente des effets matrices moins importants pour trois molécules : entre -21 et 15 % pour la bifenthrine, entre -22 et 10,5 % pour la lambda-cyhalothrine, et entre -22 et 6 % pour la cyperméthrine.

Tableau II-4 Performances de la méthode développée pour la cire d'abeille

Composés	Domaine (ng.g ⁻¹)	Modèle	r ²	LOD (ng.g ⁻¹)	LOQ (ng.g ⁻¹)	Effets de matrice (%)						Rendements d'extraction (%)						Précision intermédiaire (% RSD)	
						C2	C4	C6	C2	C4	C6	C2	C4	C6	C2	C4	C6	C2	C4
Acide-6-chloronicotinique	20-1000	Linéaire	0,9989	5	20	-12	-9	-9	73 (10)	88 (3)	74 (19)	39	34	25					
Oléfine-imidaclopride	10-500	Linéaire	0,9992	5	10	-22	-11	-12	80 (12)	83 (6)	72 (16)	45	36	26					
Thiaméthoxame	1-50	Linéaire	0,9993	1	1	-6	-10	-7	95 (12)	89 (7)	77 (14)	30	35	29					
5-hydroxy-imidaclopride	5-200	Linéaire	0,9993	2	5	-4	-2	-6	85 (3)	85 (7)	74 (15)	31	37	37					
Clothianidine	1-50	Linéaire	0,9983	1	1	-5	-10	-9	97 (2)	93 (3)	78 (12)	30	35	28					
Imidaclopride	1-50	Linéaire	0,9994	1	1	-2	-10	-6	92 (13)	94 (5)	78 (11)	37	42	36					
Acétamipride	1-50	Linéaire	0,9993	1	1	-3	-9	-9	92 (8)	93 (5)	78 (14)	4	10	10					
Thiaclopride	1-50	Linéaire	0,9998	1	1	-8	-9	-7	96 (5)	95 (2)	79 (16)	9	19	15					
Boscalide	1-50	Linéaire	0,9998	1	1	-16	-16	-38	102 (2)	98 (5)	91 (3)	15	16	16					
Lambda-cyhalothrine	40-1000	Quadratique	0,9897	40	40	-77	-85	-88	76 (32)	93 (12)	94 (3)	13	11	19					
Cyperméthrine	10-500	Quadratique	0,9560	10	10	-20	-84	-87	116 (58)	95 (24)	103 (12)	23	11	23					
Deltaméthrine	5-200	Quadratique	0,9884	5	5	17	-81	-88	95 (26)	95 (14)	90 (8)	5	5	13					
Bifenthrine	10-500	Quadratique	0,9961	5	10	-85	-91	-92	72 (35)	99 (2)	83 (15)	13	5	5					

4.2. Application à des campagnes d'analyses de pesticides dans les matrices apicoles Françaises : abeilles, cire et pain d'abeille

Cette partie vise à faire le bilan des analyses effectuées au laboratoire sur la période 2012 – 2016 sur les trois matrices étudiées : les abeilles, la cire et le pain d'abeille. Un premier paragraphe récapitule les performances analytiques des trois méthodes. Un second paragraphe expose le bilan des analyses et discute des résultats.

Les LOD et LOQ des pesticides cibles sont répertoriés dans le Tableau II-5, pour chaque matrice étudiée. Le boscalide et la famille des néonicotinoïdes présentent les limites les plus basses quelle que soit la matrice. La cire, quant à elle, présente les limites les plus élevées, en raison de sa complexité.

Dans les abeilles, les LOQ des néonicotinoïdes et de leurs métabolites sont du même ordre de grandeur, voire plus faibles que celle reportées dans d'autres études pour cette matrice. En effet, des LOQ comprises entre 0,1 et 2,0 ng.g⁻¹ ont été reportées dans les études de Kasiotis *et al.* (22) et de Gbylik-Sikorska *et al.* (130).

Tableau II-5 Limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) pour les 13 pesticides, dans les trois matrices d'intérêt : abeilles, cire et pain d'abeille

	Pain d'abeille		Abeilles		Cire d'abeille	
	LOD (ng.g ⁻¹)	LOQ (ng.g ⁻¹)	LOD (ng.g ⁻¹)	LOQ (ng.g ⁻¹)	LOD (ng.g ⁻¹)	LOQ (ng.g ⁻¹)
Néonicotinoïdes						
Acétamipride	0,01	0,07	0,13	0,43	1	1
Imidaclopride	0,04	0,2	0,17	0,54	1	1
Thiaclopride	0,02	0,1	0,05	0,17	1	1
Thiaméthoxame	0,02	0,05	0,06	0,18	1	1
Pyréthroïdes						
Bifenthrine	2,5	7,5	0,33	1,06	5	10
Lambda-cyhalothrine	0,83	2,6	1,64	5,48	40	40
Cyperméthrine	0,04	0,1	0,94	3,9	10	10
Deltaméthrine	0,1	0,18	0,15	0,49	5	5
Carboxamide						
Boscalide	0,01	0,03	0,15	0,68	1	1
Métabolite du thiaméthoxame						
Clothianidine	0,08	0,16	0,02	0,08	1	1
Métabolite de l'imidaclopride						
5-hydroxy-imidaclopride	0,25	1,35	0,23	0,74	2	5
Oléfine-imidaclopride	0,75	1,5	0,11	0,35	5	10
Métabolite de l'imidaclopride, du thiaméthoxame et de l'acétamipride						
Acide-6-chloronicotinique	12,5	40	0,21	0,71	5	20

4.2.1. Résultats des analyses et discussion

Un total de 488 échantillons (125 d'abeilles, 87 de cire et 276 de pain d'abeille) ont été analysés. En prenant en compte l'ensemble des échantillons, chacun des pesticides a été détecté au moins une fois. Douze pesticides différents ont été détectés dans les abeilles et le pain d'abeille. En revanche, seulement 6 pesticides ont été détectés dans la cire. Cette observation peut être en partie expliquée par les valeurs des LOD dans la cire, qui sont plus élevées que pour les deux autres matrices.

Abeilles

Sur 125 échantillons d'abeilles analysés, 48 se sont montrés positifs, c'est à dire qu'au moins un pesticide cible a été détecté. Ceci indique donc que 38 % des échantillons d'abeilles sont contaminés par au moins un des pesticide ciblés. En moyenne un échantillon positif contient 1,7 pesticides, le maximum observé dans les abeilles étant de 5 pesticides dans un même échantillon. Seule la deltaméthrine n'a pas été détectée dans les échantillons d'abeilles, malgré une LOD relativement faible ($0,15 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$).

Le boscalide et les néonicotinoïdes sont les pesticides les plus souvent détectés et représentent ainsi les trois-quarts des détections (Figure II-21).

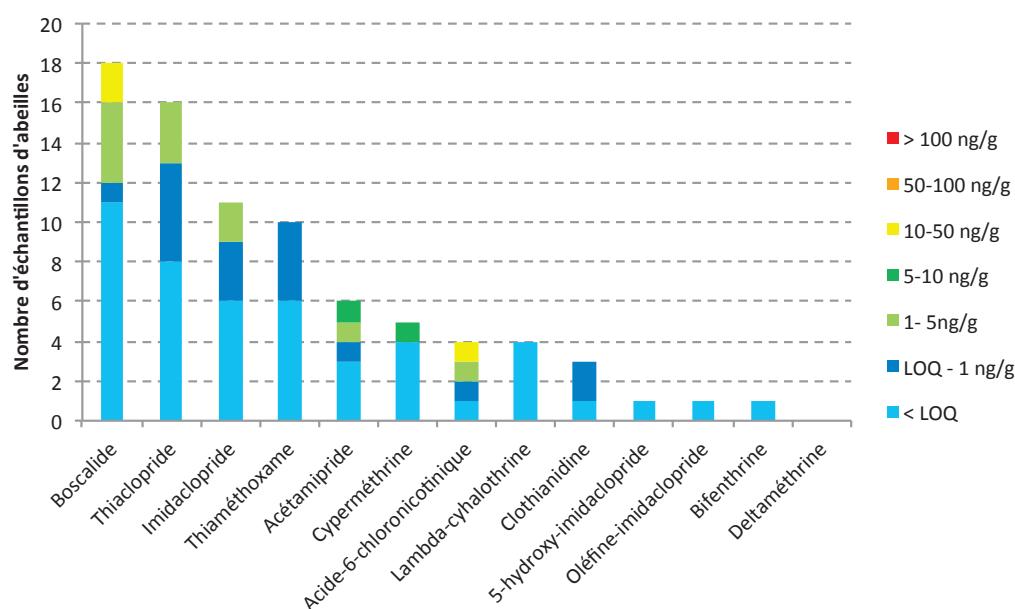


Figure II-21 Répartition des résultats de l'analyse des échantillons d'abeilles en fonction des pesticides et des concentrations

Il est important cependant de souligner que ces composés présentent les LOD les plus faibles. Le nombre de détection maximum est observé pour le fongicide boscalide (18 détections), suivi des néonicotinoïdes thiaclopride (16 détections) et imidaclopride (11 détections), ce qui représente respectivement 14%, 13% et 9% des échantillons d'abeilles. Les concentrations les plus élevées pour ces composés sont de 47,6 ng.g⁻¹ pour le boscalide, 1,6 ng.g⁻¹ pour le thiaclopride et de 1,7 ng.g⁻¹ pour l'imidaclopride. Le métabolite acide-6-chloronicotinique a été quantifié jusqu'à 12,6 ng.g⁻¹. Ce métabolite étant présent dans plusieurs voies métaboliques, sa présence à cette concentration indique une potentielle contamination de plusieurs échantillons par les néonicotinoïdes.

Toutefois, les concentrations observées dans les échantillons d'abeilles sont généralement inférieures à 1 ng.g⁻¹ pour 67 % du boscalide et au moins 80 % des autres.

Les LOQ des pyréthri-noïdes sont plus élevées (comprises entre 0,5 et 5,5 ng.g⁻¹) que celles des autres pesticides. Les résultats montrent que dans 90 % des échantillons positifs aux pyréthri-noïdes, les concentrations sont inférieures à leur LOQ. Parmi les 10 % restant, un échantillon contient de la cyperméthrine à une concentration de 6,5 ng.g⁻¹.

Par ailleurs, 30 % des échantillons révèlent la détection simultanée de deux pesticides cibles, 9 % de trois pesticides cibles et 6 % de quatre pesticides cibles. En ce qui concerne les combinaisons « inter-familles » les plus souvent rencontrées, celle du boscalide avec un néonicotinoïde se retrouve dans sept échantillons. Elle est suivie de la combinaison d'un pyréthri-noïde et d'un néonicotinoïde, qui se retrouve dans quatre échantillons.

Pain d'abeille

Le pain d'abeille est la matrice la plus contaminée avec 77 % des échantillons contenant au moins un des 13 pesticides cibles (213 échantillons positifs sur 276 échantillons analysés). En moyenne, un échantillon positif contient deux pesticides, le maximum étant de 7 pesticides cibles. Dans leur étude, Simon-Delso *et al.* (53) ont retrouvé 39 résidus de pesticides (sur les 99 recherchés) au cours de l'analyse de 108 échantillons de pain d'abeille (contre 415 résidus de pesticides pour 276 échantillons dans notre étude), résultant en une contamination moins prononcée. Cependant, les LOQ des pesticides cibles étaient plus élevées pour leur étude (100 ng.g⁻¹), ce qui pourrait expliquer ces différences.

Les pesticides les plus souvent détectés sont encore une fois le boscalide et le thiaclopride, suivis des néonicotinoïdes acétamipride, imidaclopride et thiaméthoxame

(Figure II-22). Cependant, il est important de noter que ces pesticides ont les LOD les plus faibles. Seule la cyperméthrine n'est pas détectée dans cette matrice, même en ayant une LOD relativement basse ($0,04 \text{ ng.g}^{-1}$). Le boscalide et le thiaclopride ont été détectés à 175 et à 122 reprises avec des concentrations jusqu'à 733 et 177 ng.g^{-1} respectivement. Ces résultats sont en accord avec les observations faites par Simon-Delso *et al.* (53) dans lesquelles le boscalide était le pesticide le plus souvent retrouvé. Les concentrations sont plutôt moyennes dans l'ensemble avec 70 %, 42 % et 36 % des néonicotinoïdes, pyréthri-noïdes et du boscalide présents à des concentrations supérieures ou égales à 1 ng.g^{-1} respectivement. La moitié (50 %) des échantillons contaminés par les pyréthri-noïdes et 27 % de ceux contaminés par le boscalide présentent des concentrations supérieures à 5 ng.g^{-1} . Les concentrations maximales de la delta-méthrine et de la lambda-cyhalothrine sont respectivement de $25,9$ et $27,5 \text{ ng.g}^{-1}$. Le néonicotinoïde acétamipride a quant à lui été quantifié à $171,4 \text{ ng.g}^{-1}$.

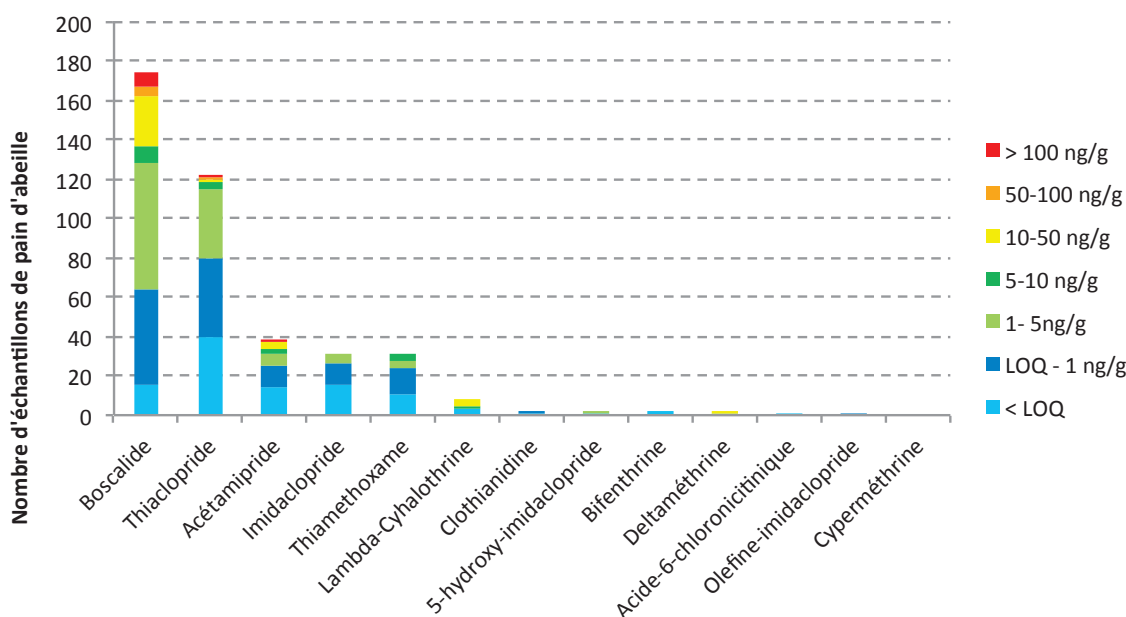


Figure II-22 Répartition des résultats de l'analyse des échantillons de pain d'abeille en fonction des pesticides et des concentrations

Par ailleurs, 41 % des échantillons révèlent la détection de deux pesticides cibles, 14 % de trois pesticides cibles, et 7 % de quatre pesticides cibles et plus. En ce qui concerne la combinaison « inter-familles » la plus souvent rencontrée (103 échantillons), il s'agit de celle qui associe au moins un pyréthri-noïde avec au moins un néonicotinoïde.

Cire d'abeille

Avec 53 échantillons contaminés par au moins un pesticide sur 87 échantillons analysés, 61 % des échantillons de cire sont contaminés. En moyenne, un échantillon positif présente 1,2 pesticides cible, le maximum étant de 3.

Les néonicotinoïdes et le boscalide sont les pesticides les plus souvent détectés dans les échantillons de cire (Figure -II-23). Étonnamment, les pyréthrinoïdes, qui sont lipophiles, ne sont pas détectés aussi souvent qu'attendu. Cette constatation est néanmoins peut-être due aux valeurs de LOD qui sont plus élevées que celles des 2 autres familles, ou bien à leur métabolisation ou dégradation. La deltaméthrine n'a été quantifiée que dans un seul échantillon, à une concentration de 28,3 ng.g⁻¹.

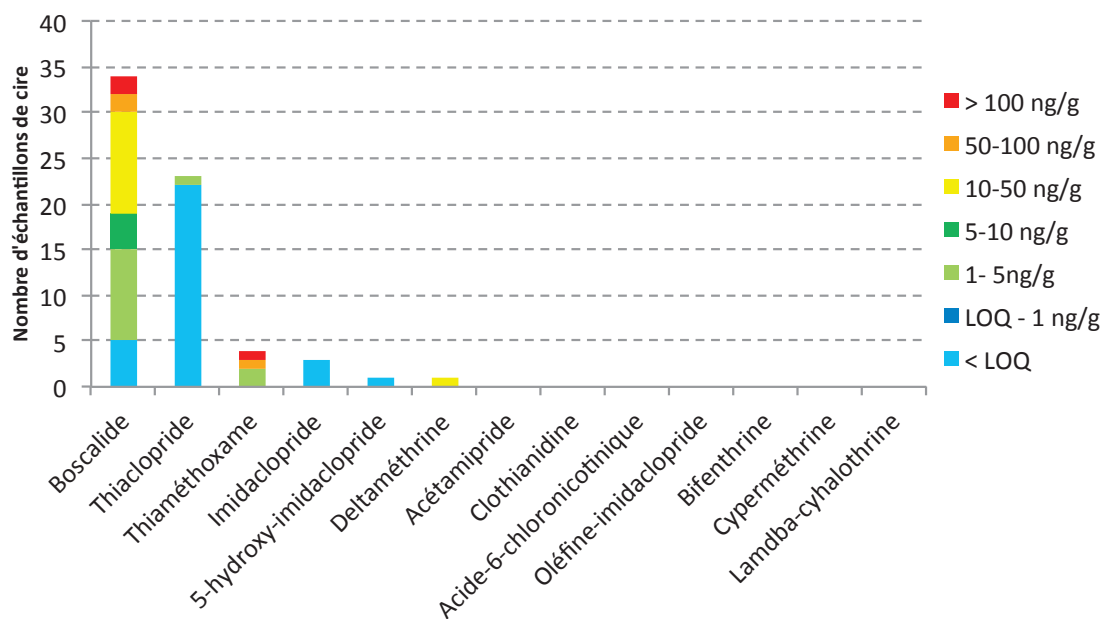


Figure -II-23 Répartition des résultats de l'analyse des échantillons de cire en fonction des pesticides et des concentrations

Les pesticides les plus souvent détectés sont encore le boscalide (39 %) et le thiaclopride (26 %) qui présentent des concentrations maximales de 302,3 ng.g⁻¹ et de 3,4 ng.g⁻¹ respectivement. Seuls 15 % des échantillons contaminés au boscalide présentent des concentration inférieures ou égales à 1 ng.g⁻¹. Des résultats similaires ont été obtenus pour le boscalide par Mullin *et al.* (84), qui reporte une détection de ce pesticide dans 10 % des échantillons analysés outre-Atlantique et pour lequel la concentra-

tion maximale est de 388 ng.g⁻¹. Les néonicotinoïdes ont également été détectés dans 4 à 6 % des échantillons de cire analysés par Herrera-López *et al.* (131), avec des concentrations atteignant 4,0 ; 5,1 et 10,4 ng.g⁻¹ pour l'acétamipride, l'imidaclopride et le thiaclopride respectivement. De la même manière, une autre étude (95) reporte la détection du thiaméthoxame, de l'acétamipride et de l'imidaclopride, avec des concentrations respectivement de 153, 61 et 39 ng.g⁻¹ dans des échantillons de cire.

Deux échantillons présentent de grandes concentrations en thiaméthoxame avec 50,9 et 106,5 ng.g⁻¹. Il est à noter que le thiaméthoxame est hautement toxique pour les abeilles, avec une DL50 (contact) de 0,02 µg par abeille soit 200 ng.g⁻¹.

Une grande partie (44 %) des échantillons contaminés par du boscalide présente des concentrations supérieures à 10 ng.g⁻¹ pour ce fongicide, et deux d'entre eux font état de concentrations supérieures à 100 ng.g⁻¹. Cependant, contrairement au thiaméthoxame, la DL50 du boscalide est relativement élevée (>200 µg par abeille soit >2 000 000 ng.g⁻¹). Néanmoins, ce fongicide peut constituer un risque modéré lorsqu'il est trouvé avec une fréquence élevée et à des concentrations relativement hautes (115).

Dans l'ensemble, les concentrations sont plus élevées dans la cire que dans les autres matrices. Ceci peut être expliqué par sa réutilisation par les apiculteurs, d'une année sur l'autre et ce pendant plusieurs années qui augmente son potentiel d'accumulation. Par ailleurs, 21 % des échantillons révèlent la détection de deux pesticides cibles, et 2 % de 3 pesticides cibles. En ce qui concerne la combinaison « inter-familles » la plus souvent rencontrée (12 échantillons), il s'agit de celle qui associe le boscalide avec au moins un néonicotinoïde.

La Figure II-24 illustre la répartition des concentrations en pesticides retrouvées dans chaque matrice : abeille, cire et pain d'abeille. Ainsi, l'abeille, matrice la moins contaminée (38 %), présente les concentrations les moins élevées (maximum 47,6 ng.g⁻¹) et les moins dispersées (comprises entre 0,1 et 47,6 ng.g⁻¹). Ces constatations peuvent probablement être en partie attribuées à la rapide métabolisation des xénobiotiques par l'abeille. On remarque en effet (Figure II-21, Figure II-22 et Figure -II-23) que les métabolites acide-6-chloronicotinique, 5-hydroxy-imidaclopride et oléfine-imidaclopride, sont retrouvés dans l'abeille, très peu dans le pain d'abeille et pas du tout dans la cire. Ces données renforcent la nécessité de développer des outils analytiques et méthodes pour inclure les métabolites et marqueurs d'exposition lors de campagnes d'analyses.

En terme de contamination, la matrice abeille est suivie du pain d'abeille, matrice la plus contaminée (77 %), qui présente les concentrations les plus dispersées (comprises entre 0,1 et 733 ng.g⁻¹). Il apparaît donc que le pain d'abeille représente une matrice de choix pour effectuer les états des lieux de la contamination des ruchers.

Enfin, la cire dont le pourcentage de contamination est de 61 %, est la matrice présentant les concentrations les plus élevées. En effet, la moitié des concentrations retrouvées dans la cire sont comprises entre 3,4 et 26,6 ng.g⁻¹, contre 0,5 à 4,2 ng.g⁻¹ pour le pain d'abeille et de 0,7 à 1,8 ng.g⁻¹ pour l'abeille.

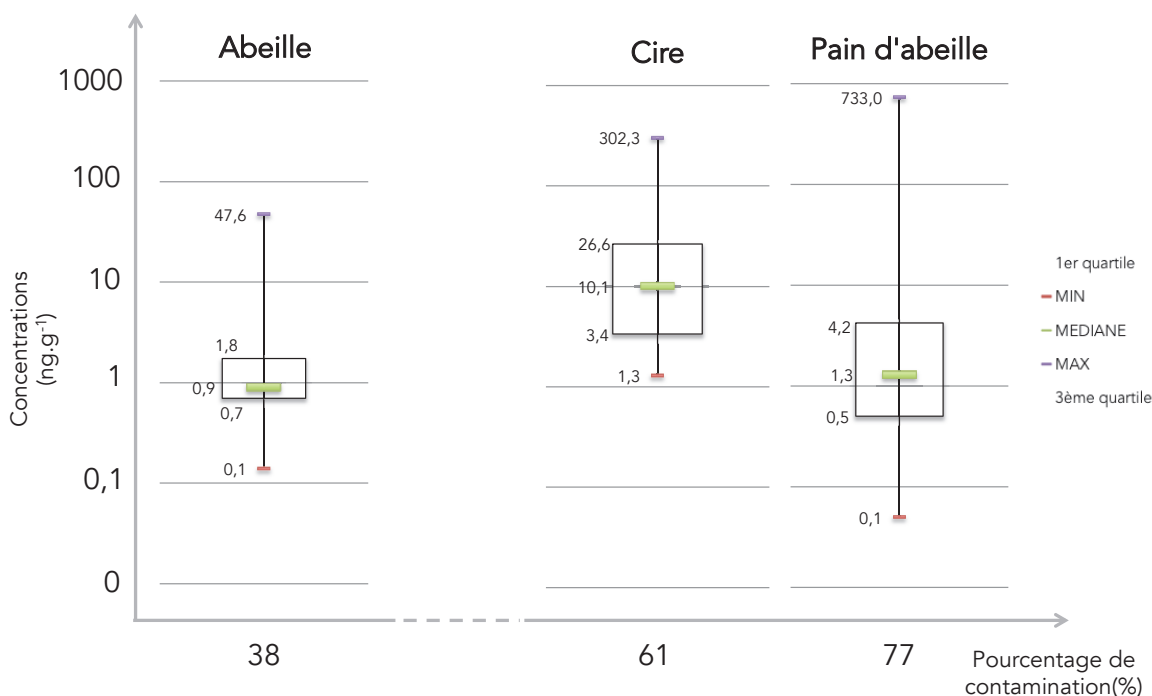


Figure II-24 Répartition des concentrations en pesticide par matrice

Bilan géographique

Les échantillons analysés proviennent de 11 régions françaises : Centre, Lorraine, Franche-Comté, Bourgogne, Rhône-Alpes, Provence-Alpes Côte d'Azur (PACA), Languedoc-Roussillon, Midi-Pyrénées, Auvergne, Poitou-Charentes et Bretagne.

La carte (Figure II-25) illustre la répartition géographique des pourcentages de contamination par région. La région la moins contaminée est la Bretagne avec 35% d'échantillon contaminés. La Franche-Comté quant à elle, est la région la plus tou-

chée avec 100 % des échantillons contaminés. Seules trois régions présentent des pourcentages de présence inférieurs à 50 % : Bretagne (35,3 %), Midi-Pyrénées (38,9 %) et Languedoc-Roussillon (28,6 %). Il faut noter que le nombre d'échantillons analysés pris en compte (n) n'est pas identique d'une région à l'autre. Ainsi, les régions Languedoc-Roussillon et Loraine sont représentés seulement par sept échantillons, alors que la région Rhône-Alpes est représentée par 235 échantillons.

Ces résultats montrent bien la très large présence des pesticides au sein des matrices apicoles françaises.

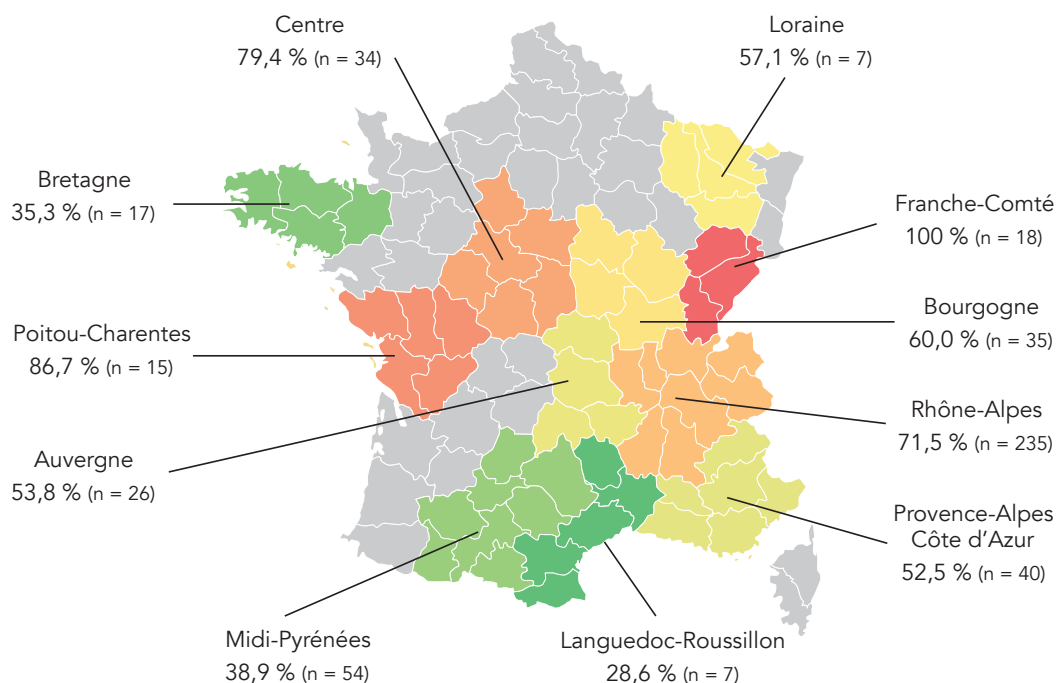


Figure II-25 Répartition géographique des pourcentages de contamination des matrices apicoles françaises

En ce qui concerne les concentrations retrouvées en fonction des régions, il existe de grandes disparités (Figure II-26). Par exemple, la région PACA présente des concentrations en pesticides moins importantes (concentration médiane = $0,6 \text{ ng.g}^{-1}$) que la région Franche-Comté (concentration médiane = $17,8 \text{ ng.g}^{-1}$). De plus, la région Franche-Comté présente une gamme de concentrations très large (de $0,1$ à 733 ng.g^{-1}) par rapport à celle de la région Centre (de $0,1$ à $17,7 \text{ ng.g}^{-1}$), par exemple.

Globalement, les concentrations retrouvées dans les matrices apicoles françaises sont inférieures à 30 ng.g^{-1} .

Il est à noter que les régions dont le nombre de résultats positifs (n) (par quantification, donc >LOQ) est inférieur à 10 ne sont pas représentées dans la Figure II-26 : Auvergne (n = 6), Bretagne (n = 4), Languedoc-Roussillon (n = 0) et Lorraine (n = 3).

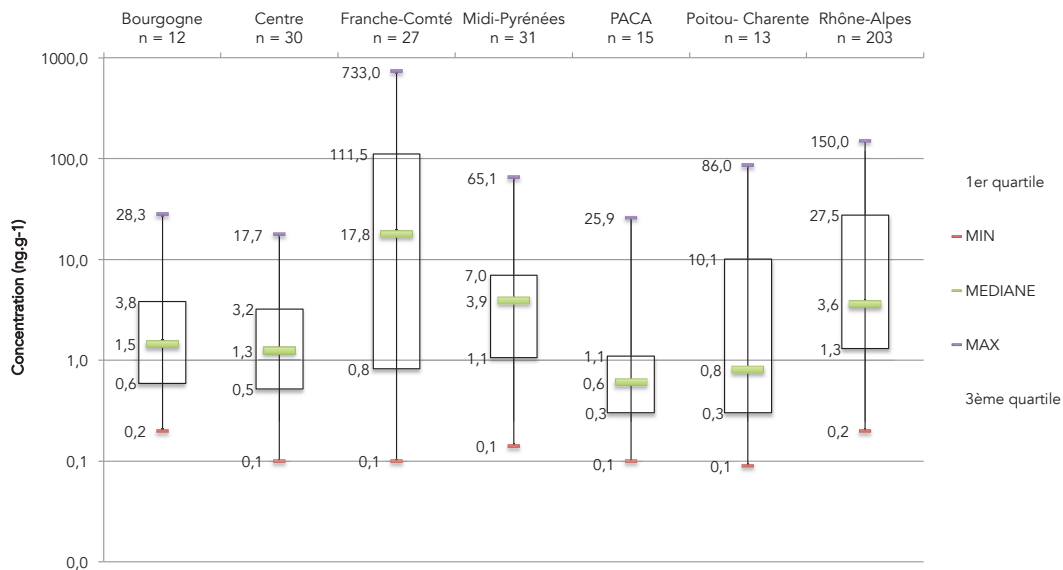


Figure II-26 Répartition des concentrations en pesticides retrouvés dans les échantillons apicoles français en fonction des régions

Impact de l'amendement de l'Union Européenne

En 2013, l'Union Européenne a adopté un règlement d'exécution restreignant l'utilisation et la vente des graines traitées avec des formulations contenant l'un des trois néonicotinoïdes : imidaclopride, clothianidine et thiaméthoxame pour les plantes qualifiées d'attractives pour les abeilles, ainsi que pour les céréales (132). Il est important de souligner qu'il s'agit uniquement du traitement des graines par enrobage alors que les autres formulations restent autorisées. Les résultats obtenus avant et après la réglementation de 2013, pour les trois néonicotinoïdes mentionnés ci-dessus, ont donc été comparés (Tableau II-6).

Il faut noter que l'utilisation de la clothianidine comme pesticide était déjà interdite en France avant 2013. Ce composé étant un métabolite du thiaméthoxame, cela peut expliquer sa détection dans les échantillons. Toutefois, ce pesticide a été détecté trois

fois avant 2013, dans des échantillons d'abeilles, et n'a ensuite plus été détecté après la restriction.

La détection d'imidaclopride dans les abeilles est similaire avant et après 2013. Au contraire, le thiaméthoxame n'est plus détecté dans les abeilles collectées après 2013. De la même manière, l'imidaclopride a été détecté dans trois échantillons de cire collectés avant 2013, mais ne l'a plus été après la restriction. En revanche, le thiaméthoxame a seulement été quantifié dans les cires collectées après 2013, avec des concentrations supérieures à 50 ng.g^{-1} pour deux des quatre échantillons. En ce qui concerne le pain d'abeille, la fréquence de détection de l'imidaclopride et du thiaméthoxame a diminué après la restriction pour les niveaux de contamination les plus faibles ($< 1 \text{ ng.g}^{-1}$). En effet, avant la restriction, 23 et 32 % des échantillons de pain d'abeille étaient contaminés par l'imidaclopride et le thiaméthoxame, contre 6 et 1,4 % respectivement après 2013. La fréquence de détection des niveaux de concentration élevés est quasiment la même qu'avant la restriction, avec environ 2 % des échantillons de pain d'abeille contaminés par l'imidaclopride ou le thiaméthoxame. Depuis le moratoire Européen, une réduction de la fréquence de détection des néonicotinoïdes aux faibles niveaux de concentration est observée, particulièrement pour le pain d'abeille. Néanmoins, cela reste inquiétant puisque ces composés peuvent être considérés comme facteurs de stress et provoquer des effets délétères sur l'ensemble de la colonie, à des niveaux sub-létaux (115,133,134).

En France, dans le cadre de la loi sur la biodiversité, l'utilisation de l'ensemble des néonicotinoïdes devrait être complètement interdite d'ici à 2018. Il serait alors intéressant de continuer à analyser de telles matrices apicoles, jusqu'à cette interdiction, et quelques années après, afin d'évaluer l'impact de la loi sur la présence des résidus de néonicotinoïdes dans les ruches, ainsi que les effets sur les troubles et mortalités observés chez les abeilles.

Tableau II-6 Comparaison (nombre et concentration en ng.g⁻¹) des résultats de la contamination des abeilles, cire et pain d'abeille par l'imidaclopride, la clothianidine et le thiaméthoxame, avant et après la restriction de leur usage en 2013

		Abeilles		Cire d'abeille		Pain d'abeille	
		≤ 2013	≥ 2014	≤ 2013	≥ 2014	≤ 2013	≥ 2014
	Nombre d'échantillons	63	62	56	31	66	210
Imidaclopride	< LOQ	3	3	3	-	9	8
	LOQ-1 ng.g ⁻¹	1	2	-	-	6	4
	1-5 ng.g ⁻¹	1	-	-	-	1	4
Clothianidine	< LOQ	1	-	-	-	-	1
	LOQ-1 ng.g ⁻¹	2	-	-	-	1	-
Thiaméthoxame	< LOQ	6	-	-	-	9	1
	LOQ-1 ng.g ⁻¹	4	-	-	-	12	2
	1-5 ng.g ⁻¹	-	-	-	2	2	2
	5-10 ng.g ⁻¹	-	-	-	-	1	2
	50-100 ng.g ⁻¹	-	-	-	1	-	-
	> 100 ng.g ⁻¹	-	-	-	1	-	-

Conclusion

Des méthodes analytiques sensibles ont été appliquées afin de détecter et quantifier 13 pesticides de la famille des néonicotinoïdes et des pyréthri-noïdes, et certains de leurs métabolites, ainsi qu'un fongicide, le boscalide, dans les matrices apicoles : abeilles, cire et pain d'abeille. Les échantillons ont été fournis par les apiculteurs de différentes régions de France, et collectés, pour la grande majorité, après que des troubles aient été observés, par exemple de fortes mortalités. Au total, 488 échantillons ont été collectés entre 2012 et 2016, puis analysés. Dans ces derniers, les pesticides les plus souvent retrouvés sont le boscalide et les néonicotinoïdes, en particulier le thiaclopride, et ce, quelle que soit la matrice. Cependant, ces pesticides présentent les plus faibles valeurs de LOD. Le pain d'abeille est la matrice la plus contaminée avec 77 % des échantillons positifs. La cire est, quant à elle, la matrice dont les concentrations en pesticide sont les plus élevées, jusqu'à 302,3 ng.g⁻¹ pour le boscalide et 106,5 ng.g⁻¹ pour le thiaméthoxame. Les résultats obtenus indiquent la contribution des pesticides à l'exposition des abeilles au sein de la ruche. Les données ont égale-

ment révélé le pain d'abeille en tant que matrice pertinente pour évaluer la contamination au sein des ruchers. Enfin, la comparaison de la contamination observée avant et après la restriction de l'utilisation des néonicotinoïdes en France montre une tendance positive de la loi sur la fréquence de détection de ces molécules, principalement aux faibles concentrations ($< 1 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$), particulièrement dans le pain d'abeille.

**Chapitre III. Identification
de métabolites chez les
abeilles**

1. Introduction et objectifs de l'étude

Ce troisième chapitre s'intéresse à la recherche et à l'identification de métabolites de pesticides dans les abeilles, et à leur quantification dans des échantillons d'abeilles appartenant à des colonies présentant des troubles.

Pour cela, une stratégie basée sur la complémentarité de deux outils a été pensée et mise en pratique. Celle-ci consiste en l'utilisation de la chromatographie liquide couplée dans un premier temps à la spectrométrie de masse à haute résolution (UHPLC-QqToF) pour la recherche et l'identification des métabolites, et dans un second temps, à la spectrométrie de masse triple quadripôle (UHPLC-QqQ) pour leur quantification dans des échantillons d'abeilles.

Au total, 5 pesticides sur les 13 du chapitre précédent sont étudiés dans cette partie : boscalide, lambda-cyhalothrine, deltaméthrine, thiaclopride et thiaméthoxame.

2. L'étude du métabolisme

2.1. Le métabolisme des xénobiotiques

2.1.1. Généralités

« Xénobiotique » est un nom donné à toute substance étrangère à un organisme et pouvant se révéler toxique ou non. Les organismes vivants, quels qu'ils soient, sont confrontés à un grand nombre de xénobiotiques dans leur environnement. S'ils sont absorbés par l'organisme, ils vont se distribuer en son sein, dans les différents organes et tissus, en fonction notamment de leurs caractéristiques physico-chimiques (lipophilie, composition chimique, etc.), et peuvent être accumulés ou métabolisés.

Le métabolisme correspond à l'ensemble des transformations (ou biotransformations) se produisant au sein d'une cellule ou d'un organisme. Les xénobiotiques peuvent être absorbés par diverses voies (orale, cutanée, pulmonaire) et entraîner des effets néfastes pour l'organisme s'ils sont toxiques. Les organismes vivants possèdent donc généralement soit des barrières physiques (la peau, les intestins, les poumons) pouvant empêcher l'entrée de ces composés dans l'organisme, soit des métabolismes particuliers pouvant dégrader ces molécules afin de les éliminer (41,135–138).

Le métabolisme des xénobiotiques consiste donc en des réactions biochimiques ayant pour but de faciliter l'excrétion des xénobiotiques (*via* les fèces, l'urine, la sueur, etc). Il existe de nombreuses réactions de biotransformations (répertoriées en Annexe 2).

Les réactions de biotransformations des xénobiotiques impliquent un réseau de détoxification propre à chaque espèce. Ce réseau regroupe généralement des enzymes particulières capables de transformer ces composés. Dans la majorité des cas, ce processus aboutit à des métabolites plus polaires et ainsi plus hydrosolubles et facilement excrétables par l'organisme. Le foie est généralement l'organe de référence en terme d'activité de biotransformation des xénobiotiques car il contient les plus grandes quantités et variétés d'enzymes impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques. Cependant, d'autres organes tels que les reins, les intestins, les poumons et la peau, ont également des capacités de biotransformation.

Les réactions de biotransformations peuvent être séparées en deux familles distinctes : les réactions de phase I et les réactions de phase II.

Réactions de phase I : Fonctionnalisation

Au cours des réactions de phase I, les xénobiotiques sont pris en charge par des enzymes de fonctionnalisation et vont principalement subir des réactions d'oxydations, d'hydrolyse, de réduction et d'hydratation. Ces dernières sont généralement regroupées sous le terme « réactions de fonctionnalisation » car elles entraînent l'introduction de groupes fonctionnels clés, comme par exemple -OH, -COOH, -NH₂. Ces réactions ont pour effet d'augmenter la polarité des xénobiotiques et de favoriser soit leur élimination soit leur conjugaison (réactions de phase II). À la suite de cette première phase, il est possible que les métabolites produits engendrent une toxicité plus importante que la molécule mère, on parle alors de bioactivation.

Parmi les enzymes intervenant lors du métabolisme de phase I, la famille des monooxygénases à cytochrome P450s (CYPs), à l'origine de réactions d'oxydation et de réduction, est prépondérante. Elle joue un rôle majeur dans le métabolisme de nombreux xénobiotiques. À l'inverse des autres enzymes métaboliques, les CYPs impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques ont une large spécificité de substrat. Les CYPs sont des enzymes membranaires principalement localisées dans le réticulum endoplasmique.

Réactions de phase II : Conjugaison

La phase II joue un rôle à la fois dans la détoxification et dans l'élimination des xénobiotiques. Il existe divers systèmes enzymatiques intervenant dans les réactions de

conjugaisons caractéristiques de la phase II. Ces enzymes agissent sur les groupes fonctionnels tels que -OH, -COOH, -NH₂, qui peuvent être soit présents naturellement sur les molécules cibles, soit ajoutés lors des réactions métaboliques de phase I. Les composés générés à l'issue des réactions de phase II sont généralement plus polaires, plus facilement excrétés et, généralement, moins réactifs.

Les réactions de phase II consistent en l'addition d'une molécule endogène hydrosoluble sur les xénobiotiques ou sur leur métabolites issus de la phase I. Parmi les substrats endogènes conjugués se trouvent par exemple : l'acide glucuronique, les acides aminés, les sucres, le glutathion. Chaque type de substrat endogène fait intervenir une famille d'enzymes spécifiques. L'étude menée ici s'est intéressée plus particulièrement à la conjugaison au glutathion, principale enzyme de phase II chez l'abeille (139), et sera donc la seule à être décrite.

La conjugaison au glutathion fait intervenir une famille d'enzymes, les glutathion S-transférases, principalement contenues dans le cytosol. Cette famille d'enzymes est présente dans la plupart des tissus et à une plus forte concentration dans le foie, les intestins, les reins et les poumons. Le glutathion est un iso-tripeptide (Figure III-1). Il intervient dans la conjugaison d'une large variété de composés électrophiles ou qui peuvent être transformés en électrophiles lors de la phase I. Le mécanisme de réaction consiste en une attaque nucléophile, par un des doublets liants du glutathion, sur un site électrophile généralement porté par un carbone substitué par un halogène de la molécule concernée.

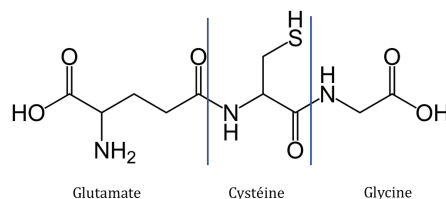


Figure III-1 Structure de l'iso tripeptide glutathion

En conclusion, le métabolisme des xénobiotiques (Figure III-2) peut se dérouler de plusieurs manières. Le xénobiotique peut subir la phase I puis la phase II avant d'être excrété, ou bien subir directement la phase II avant excrétion, ou encore ne subir que la phase I.

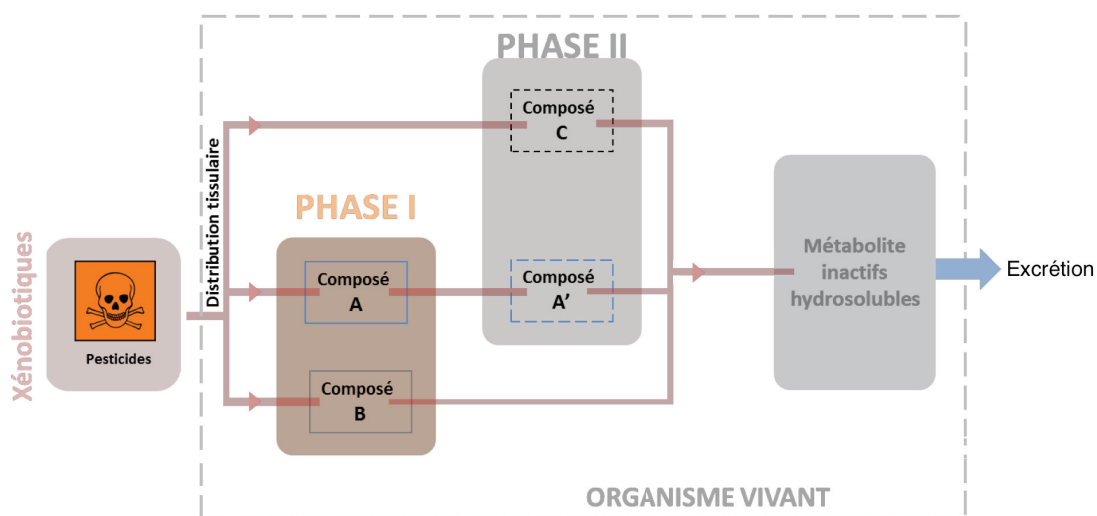


Figure III-2 Les enzymes des deux phases du métabolisme des xénobiotiques, modifiée de (138)

2.1.2. Le métabolisme des xénobiotiques chez les abeilles

Les abeilles peuvent être confrontées à de nombreux xénobiotiques dans leur environnement (parasites, poussières, pesticides, etc). En comparaison avec d'autres insectes, y compris d'autres hyménoptères, l'abeille présente un nombre moins important de gènes de détoxification, ce qui pourrait les rendre plus vulnérables, notamment aux interactions entre xénobiotiques (139).

Chez l'abeille *Apis mellifera*, la phase I de métabolisation des xénobiotiques est en majeure partie réalisée par les CYPs. Ils interviennent entre autre lors des réactions de biotransformations de flavonoïdes (pigments végétaux), de mycotoxines (toxines issues de champignons) et de pesticides tels que les organophosphates, les acaricides, les pyréthri-noïdes et les néonicotinoïdes (139). Les enzymes glutathion-S-transferases sont les principales enzymes de phase II, même si elles peuvent également intervenir en se liant directement aux xénobiotiques non fonctionnalisés (139). C'est le cas par exemple des pyréthri-noïdes (140). En ce qui concerne les néonicotinoïdes, bien que les abeilles aient une capacité de détoxification limitée, elles paraissent capables de rapidement les métaboliser et les éliminer, en quelques jours (140).

2.2.Approches expérimentales pour l'étude du métabolisme des xénobiotiques

L'identification de métabolites dans des matrices biologiques complexes est une tâche rendue difficile notamment par la présence de composés endogènes qui peuvent masquer la détection des métabolites de composés exogènes. De plus, l'identification peut être rendue encore plus complexe si la concentration des métabolites formés est très faible. La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse est devenue l'outil de choix pour la détection et l'identification de métabolites. (141)

L'étude du métabolisme des xénobiotiques fait généralement intervenir quatre étapes (142). Celles-ci seront détaillées dans les paragraphes suivants :

- La production des métabolites
- La préparation des échantillons à analyser
- La détection des métabolites
- L'identification des métabolites détectés

2.2.1.Production de métabolites : plusieurs modèles

On distingue principalement trois modèles de génération de métabolites : *in vitro*, *in vivo* et *in silico*.

- Modèle *in vitro* :

Il s'agit d'un modèle biologique qui utilise des fractions sub-cellulaires, des tissus ou encore des organes d'un organisme vivant, mais qui ne sont plus rattachés à lui. Ce modèle permet de mener des expériences dans des conditions contrôlées en dehors d'un organisme vivant, ce qui en fait un modèle peu contraignant à mettre en œuvre et moins coûteux que les autres modèles. Cependant, un de ses inconvénients est de ne pas reproduire exactement les conditions cellulaires de l'organisme. Ceci peut aboutir à des résultats qui ne correspondent pas aux résultats qui auraient été obtenus au sein de l'organisme.

- Modèle *in vivo* :

Il s'agit également d'un modèle biologique mais qui fait intervenir l'organisme vivant dans son ensemble. Ces modèles peuvent correspondre à des végétaux, des animaux ou bien à des êtres humains. Il permet d'obtenir des résultats globaux de la réponse de l'organisme à un xénobiotique et est ainsi préféré au modèle *in vitro*.

- Modèle *in silico* :

À l'inverse des deux modèles précédents, le modèle *in silico* est basé sur des méthodes informatiques et des modèles mathématiques. Il s'agit d'un modèle de prédiction et

est utilisé dans de nombreux domaines de la biologie comme la génétique. De nouveaux modèles *in silico* sont développés dans le domaine du métabolisme des xénobiotiques, et plus particulièrement des médicaments, notamment dans le cadre des études « Drug Metabolism and Pharmacokinetics » (ou DMPK), qui ont notamment pour but d'évaluer les molécules candidates à être des médicaments humains, en amont de leur développement. Dans le domaine de l'identification de métabolites de xénobiotiques, des logiciels existent tels que METEOR (Lhasa Ltd.) ou encore Pallas (CompuDrug Inc.), et permettent de prédire les potentiels métabolites d'une substance donnée, en prenant en compte les données issues de la littérature, les règles de réaction de métabolisation, etc.

L'étude présentée ne traitant que des deux modèles biologiques, *in vitro* et *in vivo*, seuls ces derniers seront décrits.

Modèle *in vitro*

Les études *in vitro* peuvent être menées sur divers supports tels que les organes, les tissus et les fractions sub-cellulaires. Ici, seules les fractions sub-cellulaires ont été utilisées et seront donc décrites.

Les fractions sub-cellulaires sont obtenues par broyage tissulaire suivi d'une lyse cellulaire puis de plusieurs centrifugations différentielles. La force de centrifugation appliquée détermine la nature de la fraction cellulaire obtenue. Le schéma présenté dans la Figure III-3 illustre quelques-unes des fractions sub-cellulaires que l'on peut obtenir.

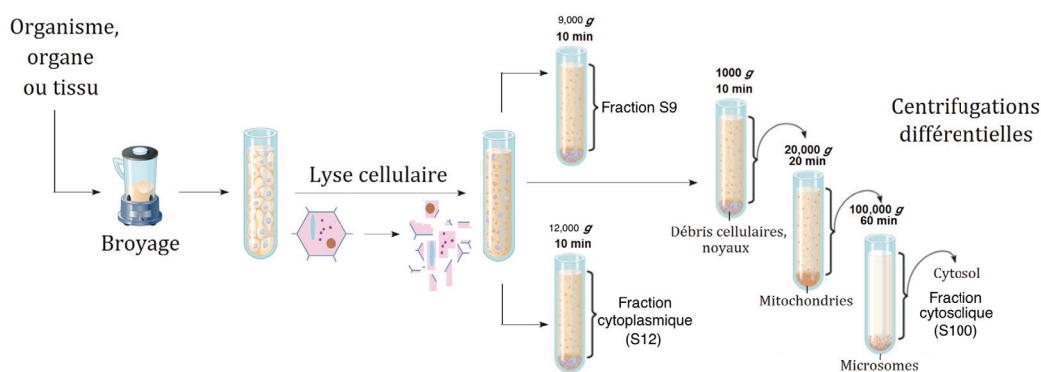


Figure III-3 Obtention des différentes fractions cellulaires par centrifugation différentielle (modifié de (143))

Plusieurs types de fractions sub-cellulaires peuvent être utilisées en fonction de l'application envisagée. Les trois principales sont (135,144) :

- Les microsomes :

Les microsomes sont des vésicules de réticulum endoplasmique qui contiennent plusieurs enzymes membranaires dont les CYPs. L'étude du métabolisme de xénobiotiques à partir des microsomes permet notamment d'avoir accès à une information ciblée en réalisant l'étude dans des conditions contrôlées. Leur préparation est très délicate et nécessite une température constante d'environ 0 °C. Cependant cette fraction cellulaire bénéficie d'une souplesse d'utilisation puisque les microsomes peuvent être conservés au congélateur (-80 °C). En revanche, cette fraction cellulaire ne permet pas d'obtenir le profil métabolique global d'un xénobiotique en raison de l'absence des enzymes solubles présentes dans le cytosol.

- La fraction S9 :

La fraction S9 fait référence au surnageant issu de la centrifugation (9000 x *g*) de la préparation cellulaire. Cette fraction contient les enzymes microsomales et cytosoliques (enzymes solubles). Cette fraction est particulièrement intéressante pour l'étude de réactions séquentielles faisant intervenir à la fois les réactions de phase I et les réactions de phase II. Cependant, l'activité enzymatique d'une fraction S9 reste inférieure à celle obtenue à partir des microsomes en ce qui concerne les enzymes microsomales, ou à partir du cytosol pour les enzymes solubles.

- La fraction cytosolique :

La fraction cytosolique, ou S100, correspond au cytosol. Elle est obtenue à l'issue d'une ultra-centrifugation (100 000 x *g*). Celle-ci permet, d'une part d'obtenir les microsomes qui se trouvent dans le culot, et d'autre part la fraction S100 qui correspond au surnageant. Cette fraction contient plus particulièrement trois des enzymes solubles de phase II, dont les glutathion-S-transférases (conjugaison au glutathion). Cette fraction est avantageuse lorsque le but est d'étudier plus spécifiquement chacune des enzymes car leur concentration y est supérieure à celle de la fraction S9.

Une autre fraction, moins répandue mais utilisée dans l'étude, peut être employée lors de tests *in vitro*. Il s'agit du surnageant post-mitochondrial ou S12, nommé fraction cytoplasmique dans ce manuscrit. Elle correspond au surnageant obtenu après une étape de centrifugation à 12 000 x *g*, durant laquelle les débris tissulaires, les noyaux ainsi que les fractions mitochondriales et lysosomales sont éliminés (culot). Cette fraction permet d'étudier le métabolisme hydrolytique et conjugatif.

Généralement, les études *in vitro* sont réalisées à partir de plusieurs fractions cellulaires afin d'avoir des informations complémentaires. Il est possible, par exemple, d'utiliser les microsomes pour étudier le métabolisme oxydatif, et la fraction post-mitochondriale pour le métabolisme hydrolytique et conjugué.

Modèle *in vivo*

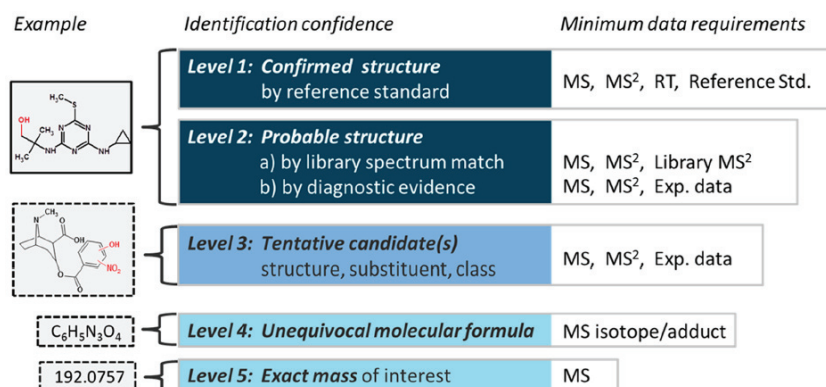
Les études *in vivo* sont menées sur les organismes entiers. Elles peuvent être effectuées sur un seul individu ou sur des populations. De plus, elles peuvent être réalisées en laboratoire dans des conditions contrôlées ou bien en conditions semi-contrôlées.

Seule l'expérimentation *in vivo* permet de mesurer le réel impact et le devenir des xénobiotiques dans un organisme. De nombreux paramètres peuvent ainsi être mesurés tout au long des expériences (poids, taille, analyses sanguines, ...). Plusieurs paramètres sont à définir tels que le mode d'administration (ingestion, contact, intraveineux, ...) ou encore la période d'exposition (24 h, 48 h, ...), etc.

L'avantage des modèles *in vivo* est d'intégrer la totalité des effets potentiels d'un perturbateur donné et de ses métabolites dans un contexte physiologique, ce qui n'est pas le cas des modèles *in vitro*. Cependant, les expériences *in vivo* sont généralement plus délicates, plus coûteuses et plus longues à mettre en place.

2.2.2. Traitement des données : critères d'identification

Dans le cadre des études de métabolomique, plusieurs niveaux d'identification des métabolites (endogènes ou xénobiotiques) ont été définis par le groupe de travail « Metabolomics Standard Initiative » ou MSI. En 2007, quatre niveaux avaient alors été définis (145). Cependant, l'expérience a montré que ces quatre niveaux n'étaient pas toujours suffisants et qu'il existait des études dont les données expérimentales validaient largement les critères requis pour un niveau donné mais ne permettaient pas de valider les critères du niveau supérieur. Cette observation, réalisée par une équipe de l'Eawag (Suisse), a donné naissance à une nouvelle classification, élargie à « l'identification de petites molécules *via* la spectrométrie de masse à haute résolution » (146). Au total, cinq niveaux d'identification ont été proposés (Figure III-4), chacun correspondant à des critères bien définis qui sont présentés ci-après.



Note: MS² is intended to also represent any form of MS fragmentation (e.g., MS³, MSⁿ)

Figure III-4 Niveaux de confiance pour l'identification des petites molécules par HR-MS, d'après (146)

- Niveau 1 : Structure confirmée

Il s'agit de la situation idéale pour laquelle la structure proposée a été confirmée par la comparaison des données obtenues avec celles d'un étalon de référence analysé dans les mêmes conditions que l'échantillon. Pour cela, il faut obtenir une correspondance pour trois critères : le spectre de masse (MS), le spectre de fragmentation (MS/MS) et le temps de rétention (t_R).

- Niveau 2 : Structure probable

Le niveau 2 indique qu'il est possible de proposer une structure exacte en utilisant différentes preuves. Ce niveau est divisé en deux sous-niveaux.

- le sous-niveau 2a (« Library ») : implique la correspondance des données spectrales avec celles reportées dans la littérature ou dans les bibliothèques de spectres
- le sous-niveau 2b (« Diagnostic ») : correspond au cas pour lequel aucune autre structure ne correspond aux données expérimentales mais pour laquelle aucune information n'est disponible dans la littérature et aucun étalon n'est reporté. Dans ce cas les preuves peuvent correspondre par exemple à des fragments (MS/MS) et/ou à un comportement à l'ionisation, des informations sur le composé parent, ainsi que des informations sur les conditions expérimentales.

- Niveau 3 : Candidat(s) provisoire(s)

Ce niveau correspond à une zone dans laquelle seront classés les métabolites pour lesquels il existe des preuves et des informations pour leur attribuer des structures

possibles, mais qui restent insuffisantes pour pouvoir en choisir une seule. Cela peut, par exemple, être le cas d'isomères de position.

- Niveau 4 : Formule brute sans équivoque

Le niveau 4 est atteint lorsque il est possible d'attribuer une formule brute sans équivoque, en utilisant les données spectrales (adduit, isotope et/ou informations de fragmentation) mais qui ne sont pas suffisantes pour proposer des structures possibles. Pour ce niveau, l'analyse MS/MS peut ne contenir aucune information, contenir des interférences ou même ne pas exister.

- Niveau 5 : Masse exacte (m/z)

Ce dernier niveau regroupe les ions pour lesquels une masse exacte a été obtenue et qui présente un intérêt certain pour la recherche menée, mais pour laquelle il y a un manque d'information, même pour lui attribuer une formule brute.

2.3. Marqueurs d'exposition aux pesticides

L'exposition des abeilles aux pesticides peut être mesurée de plusieurs façons. L'une d'elle est d'utiliser des marqueurs d'expositions. Ces derniers jouent le rôle de preuve de contact avec le pesticide. En effet, suite à des réactions métaboliques ou à des processus de dégradation post-mortem, les pesticides peuvent ne plus être présents dans les abeilles au moment du prélèvement, d'où l'utilité des marqueurs d'expositions.

Les marqueurs d'exposition peuvent être de différente nature. On distingue généralement les marqueurs biologiques (biomarqueurs d'effet, traduisant les conséquences physio-pathologiques) et les marqueurs chimiques (marqueurs d'exposition, correspondant aux résidus (parent et métabolites) de polluant dans l'organisme).

Les biomarqueurs d'effet sont des composés intrinsèques aux espèces étudiées et dont l'activité ou la concentration peuvent être modifiées suite à l'exposition de l'organisme à des composés tels que les pesticides. Chez l'abeille, un exemple de biomarqueur est l'enzyme acétylcholinestérase (AChE), pour laquelle une augmentation d'activité est observée suite à l'exposition des abeilles à des produits tels que les néonicotinoïdes (147).

En ce qui concerne les marqueurs d'exposition, il s'agit généralement de la molécule mère ou de ses métabolites. La présence de ces composés, même en l'absence de la molécule mère, est alors la preuve de l'exposition de l'organisme au pesticide (148).

2.4. Préparation d'échantillons

L'identification de métabolites nécessite l'obtention d'extraits purifiés, et si possible concentrés, dont les composés matriciels et autres composés interférents ont été éliminés. Pour cela, plusieurs méthodes d'extraction sont reportées, dépendant principalement du modèle biologique utilisé.

Les échantillons *in vitro* (fractions sub-cellulaires), subissent principalement une précipitation des protéines. Cette dernière peut être réalisée par ajout d'acides ou de solvant organique. Cependant, l'ajout d'acide entraînant une hydrolyse de certains métabolites conjugués (glucuronides, sulfates, etc.) il est alors préférable d'utiliser les solvants organiques, dont les principaux sont l'acétonitrile et le méthanol. Il arrive parfois que d'autres techniques telles que les extractions SPE ou LLE soient utilisées en plus de la précipitation des protéines.

Les échantillons *in vivo* sont, quant à eux, préparés par des méthodes classiques de SPE et LLE. Il arrive cependant que les matrices biologiques telles que l'urine ou la bile puissent directement être injectées, sans subir d'extraction ou de purification. Généralement, l'extraction est réalisée sur un organe (foie, rein, etc.) ou sur un fluide biologique (urine, sang, bile, etc.). Cependant, dans le cas des organismes de petite taille, tels que les abeilles, l'extraction est généralement réalisée sur une population d'individus et donc sur l'organisme entier (141,142,149).

3. Matériels et méthodes

3.1. Abeilles *Apis mellifera*

3.1.1. Abeilles pour la production des métabolites

La production des métabolites par l'utilisation d'expériences *in vitro* et *in vivo*, a été réalisée à partir des abeilles des ruchers expérimentaux de l'INRA d'Avignon (Équipe Toxicologie Environnementale, UMR 406 – France).

3.1.2. Échantillons d'abeilles pour la détection et la quantification des métabolites

Au total, 37 échantillons d'abeilles, provenant de différents ruchers français, ont été collectés par des apiculteurs au cours de la saison apicole 2015. L'échantillonnage a été réalisé, suite, soit à des troubles observés chez les abeilles, soit à des mortalités anormales. Ces abeilles sont stockées à -20°C jusqu'à l'analyse.

La quantification a été réalisée par *matrix-matched* à partir d'abeilles blanches provenant de l'île d'Ouessant (Océan Atlantique – France) où l'usage de pesticides est interdit. Ces abeilles sont stockées à -20°C jusqu'à utilisation.

3.2. Modèle *in vitro*

3.2.1. Réactifs et solutions

Solutions mères

Pour le boscalide, le thiaclopride et le thiaméthoxame les substances actives pures ont été utilisées. Elles ont été commandées chez le fournisseur Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) et ont une pureté supérieure à 99%. Les solutions sont préparées dans de l'eau à 1% d'acétone (pour thiaclopride et boscalide) et 2% d'acétone pour le thiaméthoxame. La concentration finale est de 100 µg.mL⁻¹.

En revanche, pour la deltaméthrine et la lambda-cyhalothrine, en raison de leur faible solubilité dans l'eau, et en prenant en compte l'impossibilité d'utiliser une quantité importante de solvant organique pour les expériences *in vitro*, au risque de compromettre le matériel biologique, ce sont donc les produits commerciaux miscibles à l'eau qui ont été utilisés.

Pour la lambda-cyhalothrine le produit commercial utilisé est KarateXpress-Syngenta granule à 5% de substance active. En ce qui concerne la deltaméthrine, le produit commercial utilisé est Décis Protech-Bayer solution aqueuse à 15 g.L⁻¹. Les solutions sont préparées dans de l'eau et la concentration finale en matière active est également de 100 µg.mL⁻¹.

Réactifs

Les produits utilisés pour la préparation des différentes fractions cellulaires proviennent de Sigma-Aldrich : phosphate de sodium, chlorure de magnésium, chlorure de potassium, glutathion, acide trichloroacétique, éthylène diamine tétra-acétique (EDTA), glucose-6-phosphate (G6P), glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH), β-nicotinamide adénine dinucléotide phosphate hydrate (β-NADP⁺), saccharose, phényl méthyl sulfonyl fluoride (PMSF), inhibiteur de trypsine, glycérol, cocktail d'inhibiteurs de protéases.

Milieus

Quatre milieux, trois pour la préparation de la fraction cellulaire microsomale (homogénéisation, re-suspension et métabolisation) et un pour la préparation de la fraction cellulaire cytoplasmique (homogénéisation), ont été nécessaires. Le Tableau III-1 présente le détail de la composition de chaque milieu.

3.2.1. Protocole d'obtention des extraits *in vitro*

Prélèvement des abeilles

Les abeilles sont prélevées au rucher de l'Unité Mixte de Recherche Abeille et Environnement à l'INRA d'Avignon. Elles sont ensuite endormies au dioxyde de carbone et congelées à une température de -150 °C. La Figure III-5 illustre cette étape de prélèvement.



Figure III-5 Prélèvement et endormissement des abeilles

Tableau III-1 Composition des milieux pour l'obtention des fractions cellulaires

Fraction	Milieu	Composition	
		Composé	Concentration
Microsomale	Homogénéisation	Saccharose	250 mM
		Chlorure de magnésium	5 mM
		Chlorure de potassium	50 mM
		EDTA	0,1 mM
		PMSF	1 mM
		Inhibiteur de trypsine	0,1 mg/mL
		Cocktail inhibiteur	/
	Resuspension	Glycérol	20%
		Chlorure de magnésium	5 mM
		Chlorure de potassium	50 mM
		EDTA	0,1 mM
		Phosphate de sodium	100 mM
		Inhibiteur de trypsine	0,1 mg/mL
		Cocktail inhibiteur	/
	Métabolisation	Chlorure de magnésium	6,25 mM
		Phosphate de sodium	125 mM
		NADP ⁺	1,25 mM
		G6P	1,25 mM
		G6PDH	10 unités/mL
		Inhibiteur de trypsine	0,1 mg/mL
		Cocktail inhibiteur	/
Cytoplasmique	Homogénéisation	Chlorure de magnésium	5 mM
		Chlorure de potassium	50 mM
		Phosphate de sodium	100 mM

Récupération des abdomens

Une fois les abeilles congelées, elles sont déposées dans un flacon de verre préalablement refroidi (à - 20°C). Une forte agitation manuelle du flacon permet de rompre les liaisons entre les différentes parties du corps des abeilles et d'obtenir un mélange de : têtes, thorax et abdomens. Un premier tri est réalisé à l'aide d'un tamis et permet

d'éliminer les pattes, antennes et ailes, puis un tri manuel à l'aide de pinces est réalisé afin de récupérer uniquement les abdomens. La Figure III-6 illustre ces étapes.

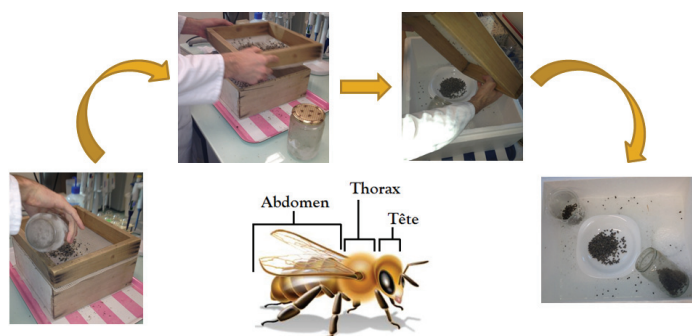


Figure III-6 Récupération des abdomens d'abeilles

Préparation de l'extrait d'abeille

Les abdomens sont ensuite pesés et ajoutés au milieu d'homogénéisation propre à chaque fraction cellulaire (cytoplasmique ou microsomale). La quantité d'abdomen représente 10 % (poids/volume) de la solution d'homogénéisation donc par exemple on ajoutera 250 mL de solution pour 25 g d'abdomens.

Une première étape de broyage est réalisée à l'aide d'un broyeur à lame. Le récipient du broyeur est maintenu dans un bain de glace. Ce dernier est ensuite filtré à l'aide d'un voile fin puis transvasé dans un broyeur de Potter de verre afin d'achever l'homogénéisation. Le broyeur de Potter permet de rompre la paroi des cellules et ainsi d'en libérer le contenu (cytoplasme). Ces étapes sont présentées dans la Figure III-7.

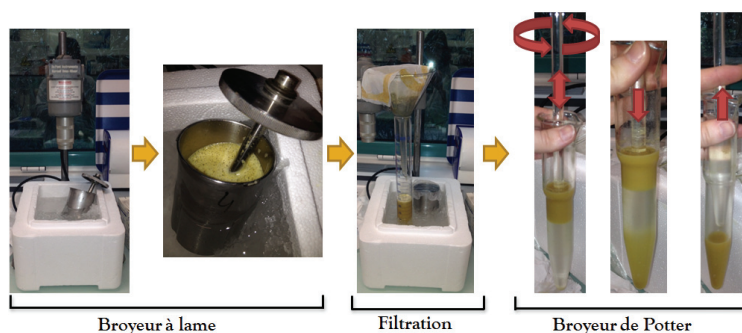


Figure III-7 Préparation du broyat d'abeilles

Obtention des fractions cellulaires microsomale et cytoplasmique

Les deux fractions cellulaires sont obtenues par centrifugations différentielles du broyat d'abeilles. Les centrifugations sont réalisées à 4 °C avec le rotor Kontron TFT 45.94 (Figure III-8).



Figure III-8 Centrifugation du broyat d'abeille en vue de l'obtention des différentes fractions cellulaires

- Obtention de la fraction microsomale :

À l'issue du broyage par le broyeur de Potter, une première centrifugation est réalisée à 30 000 *g* pendant 20 min. Cette première étape élimine les débris tissulaires, les noyaux, les fractions mitochondriales, lysosomales et membranaires. Le surnageant est récupéré pour subir une seconde centrifugation, celle-ci à 100 000 *g* pendant 60 min. Après cette étape, le surnageant est éliminé. Seul le culot microsomal est conservé. Ce culot est ensuite rincé trois fois avec du milieu d'homogénéisation. Puis il est remis en solution avec du milieu de resuspension. Cette solution microsomale sera utilisée pour réaliser la première partie des expériences de métabolisation.

- Obtention de la fraction cytoplasmique :

La fraction cytoplasmique correspond au surnageant d'une seule étape de centrifugation. Elle est réalisée à 12 000 *g* pendant 20 min et permet d'éliminer les débris tissulaire, les noyaux, les fractions mitochondriales et lysosomales. Ce surnageant sera utilisé pour réaliser la seconde partie des expériences de métabolisation.

Activation et arrêt des réactions de métabolisation *in vitro*

La réaction de métabolisation est réalisée dans des tubes contenant les différentes solutions nécessaires aux réactions de métabolisation. Le Tableau III-2 liste les différentes solutions utilisées pour chaque métabolisme étudié, le microsomal et le cytoplasmique. Les tubes sont ensuite placés sur une table d'agitation horizontale. Deux temps de métabolisation sont étudiés : T2 = 2 h et T6 = 6 h. Ensuite, la réaction

métabolique est arrêtée en mettant les tubes au congélateur à -80°C . Le stockage de ces extraits est ensuite réalisé à -20°C jusqu'à leur analyse.

Tableau III-2 Composition des deux milieux de métabolisation *in vitro* : microsomal et cytoplasmique

Métabolisme microsomal	Métabolisme cytoplasmique
Milieu d'incubation	Suspension cytoplasmique
+ Pesticide	+ Pesticide
+ Suspension microsomale (+NADPH)	+ Avec/Sans glutathion

Préparation d'échantillon

En vue de l'analyse, une préparation d'échantillon par précipitation des protéines à l'aide d'un solvant organique est réalisée. Pour cela, de l'ACN est ajouté à l'extrait dans les proportions 70/30 ACN/extrait *in vitro* (v:v). La précipitation des protéines est donc réalisée avec 300 μL d'extrait auxquels sont ajoutés 700 μL d'ACN.

Ensuite une étape de centrifugation ($13\,000 \times g$, 15 min) permet de récupérer le surnageant exempt de protéines afin de réaliser l'analyse.

3.3. Modèle *in vivo*

3.3.1. Réactifs et solutions

Solutions de pulvérisation

Les pesticides utilisés pour l'étude du métabolisme *in vivo* sont les solutions commerciales afin de réaliser l'étude dans des conditions se rapprochant au mieux de la réalité (Tableau III-3). Les solutions de pulvérisation sont réalisées soit par dilution lorsqu'il s'agit de produits liquides, soit par dissolution dans de l'eau distillée lorsqu'il s'agit de produits solides.

Les concentrations des solutions de pulvérisation sont de 31 mg.L^{-1} pour la deltaméthrine (Decis Protech-Bayer), 27 mg.L^{-1} pour la lambda-cyhalothrine (Karate Xpress-Syngenta), 5000 mg.L^{-1} pour le boscalide (Cantus-BASF), 416 mg.L^{-1} pour le thiaclopride (Calypso-Bayer) et de 20,8 mg.L^{-1} pour le thiaméthoxame (Flagship Pro-Syngenta). Elles ont été choisies à partir des données écotoxicologiques de l'équipe

Abeilles et Environnement (INRA), notamment les courbes dose/mortalité et mortalité/temps, dans le but de limiter la mortalité tout en assurant la métabolisation des pesticides, afin de récupérer suffisamment d'abeilles pour appliquer le protocole d'extraction et suffisamment de métabolites pour pouvoir les détecter.

Nourrissement des abeilles

Pour réaliser les réactions de métabolisation *in vivo*, les abeilles sont placées dans des cagettes munies de deux tubes, l'un contenant de l'eau, l'autre contenant une pâte de nourrissement (APIFONDA) contenant du saccharose (83%), du sirop de glucose, du sirop de fructose ainsi que de l'invertase.

Tableau III-3 Liste des produits phytosanitaires utilisés dans le cadre des expériences *in vivo*

Famille	Molécule	Produit phytosanitaire		Concentration en substance active	Formulation	Doses d'utilisation ^a	
		Nom	Marque			g.ha ⁻¹	ng.g ⁻¹ d'abeille ^b
Néonicotinoïdes	Thiaméthoxame	Flagship Pro®	Syngenta	10 g.L ⁻¹	Liquide	20 - 100	2 000 - 10 000
	Thiaclopride	Calypso®	Bayer	480 g.L ⁻¹	Concentré fluidifiable	72 - 120	7 200 - 12 000
Carboxamide	Boscalide	Cantus®	BASF	500 g.kg ⁻¹	Granulés dispersables	200 - 1 500	20 000 - 150 000
Pyréthrinoïdes	Deltaméthrine	Decis Protech®	Bayer	15 g.L ⁻¹	Emulsion aqueuse	7,5	75
	Lambda-cyhalothrine	Karate Xpress®	Syngenta	50 g.kg ⁻¹	Granulés dispersable	6,5 - 20	650 - 2 000

^a D'après Index Phytacta

^b Détail du calcul des doses d'utilisation en ng/abeille :

On estime qu'une abeille représente une surface de 1 cm² et pèse 100 mg. La dose à l'hectare est alors convertie en dose au centimètre carré (1 ha = 1.10⁹ cm²) pour ensuite correspondre à une dose par abeille puis à une dose en nanogramme par gramme d'abeille.

3.3.2. Protocole d'obtention des extraits *in vivo*

Obtention et pulvérisation des échantillons d'abeilles

Les abeilles sont prélevées puis endormies au dioxyde de carbone de la même manière que dans la section précédente. En revanche, elles ne sont pas placées au congélateur mais sont réparties dans des cagettes munies d'aérations. Une trentaine d'abeilles sont placées dans chaque cagette.

Une fois les abeilles réparties dans les différentes cagettes, celles-ci sont placées dans une étuve pendant 24h. L'étuve est conditionnée à une température de 28 °C. Un récipient contenant de l'eau et ouvert est placé à l'intérieur afin de reproduire les conditions interne d'une ruche en terme de température et d'hygrométrie. Après 24 h, les cagettes sont inspectées afin d'éliminer les abeilles mortes durant cette période et de les remplacer par des abeilles vivantes.

Ce protocole, illustré dans la Figure III-9, permet ainsi de réaliser l'étude de métabolisation *in vivo* dans des conditions contrôlées.



Figure III-9 Protocole de mise en cagette des abeilles en vue de l'étude du métabolisme *in vivo*

La mise en contact entre les abeilles et les pesticides est réalisée par pulvérisation des solutions commerciales contenant les substances actives, *via* une tour de pulvérisation de type Potter-Burgerjon. Cet instrument est préalablement calibré et rincé plusieurs fois et des rinçages sont également effectués entre les applications des différentes solutions afin d'exclure toute contamination.

Le protocole de pulvérisation est illustré dans la Figure III-10. Pour cela, les abeilles sont de nouveau endormies, puis déposées sur le disque de pulvérisation. Ce disque est ensuite placé dans la tour et la mise en contact des abeilles avec les pesticides est alors effectuée par pulvérisation de 30 mL de solution, de façon à avoir un dépôt de 350 L.ha⁻¹. Après cela, les abeilles sont réinsérées dans leur cagette puis placées dans l'étuve pour une durée de 24 h (temps de métabolisation).

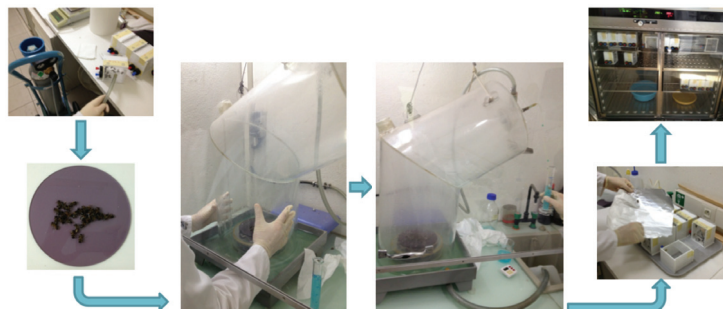


Figure III-10 Protocole de pulvérisation pour l'étude du métabolisme *in vivo*

À l'issue des 24 h, les abeilles mortes sont comptées pour estimer le taux de mortalité et mises de côté. Puis, les abeilles vivantes sont placées au congélateur pour arrêter la réaction de métabolisation. Elles sont ensuite maintenues à - 20 °C jusqu'à leur analyse.

Préparation d'échantillon

Les abeilles subissent le protocole d'extraction présenté dans le chapitre précédent (3.5.1), mais la dernière dilution n'est pas effectuée afin d'éviter la diminution du signal. C'est donc l'extrait organique (MeOH) qui est analysé ici.

3.4. Analyse des extraits par HPLC-HRMS pour l'identification des métabolites

3.4.1. Appareillage HPLC-HRMS

Les analyses des extraits *in vitro* et *in vivo* sont réalisées à l'aide d'un couplage HPLC-QqToF composé :

- d'un système UHPLC (Ultimate 3000-Dionex) pour la séparation
- d'une source ESI (Apollo II TM -Bruker) pour l'ionisation
- d'un détecteur MS muni d'un analyseur hybride QqToF c'est à dire quadrupôle (Q)/temps de vol (« Time of Flight » ou « ToF ») (MicroTOF-Q II - Bruker) pour la détection

Ce système analytique est présenté dans la Figure III-11.

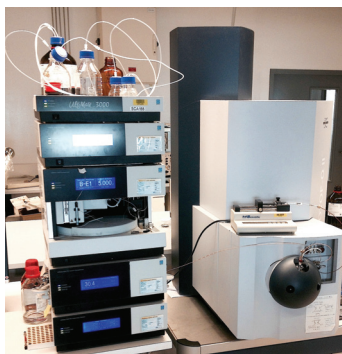


Figure III-11 Couplage UHPLC-MS utilisé pour les analyses des extraits *in vitro* et *in vivo* - Ultimate 3000 (Dionex) et MicrOTOF-Q II (Bruker)

3.4.2. Détection par spectrométrie de masse à haute résolution

La spectrométrie de masse à haute résolution est un outil puissant pour la caractérisation, l'élucidation et l'identification des métabolites, notamment grâce à (150) :

- la mesure de la masse exacte du m/z des ions moléculaires et ions fragments
- la détermination des abondances isotopiques relatives des ions moléculaires et ions fragments
- la fragmentation des ions moléculaires permettant d'obtenir des informations sur la structure des métabolites
- la comparaison des données expérimentales avec celles des bases de données (formules brutes, masses monoisotopiques, etc.), celles des bibliothèques spectrales donnant accès aux données de séparation chromatographique (temps de rétention) et aux données de détection par spectrométrie de masse (spectres de masse, spectres de fragmentation)

Analyseur à temps de vol

L'analyseur à temps de vol (Figure III-12) permet de séparer les ions en fonction de leur vitesse de déplacement à l'intérieur d'un tube de vol, libre de tout champ et soumis à un vide poussé, suite à une accélération initiale par un champ électrique. La séparation des ions est donc dépendante uniquement de la vitesse acquise lors de la phase d'accélération. Le rapport m/z est ensuite déterminé par la mesure du temps mis par les ions pour parcourir la distance entre la source et le détecteur. Les ions de faibles masses se déplaceront plus rapidement et atteindront le détecteur avant les ions de masses plus importantes.

En ce qui concerne les premiers analyseurs à temps de vol, de géométrie linéaire, ils présentent certaines limitations en terme de résolution de part l'hétérogénéité de la distribution de l'énergie cinétique et de la distribution spatiale des ions.

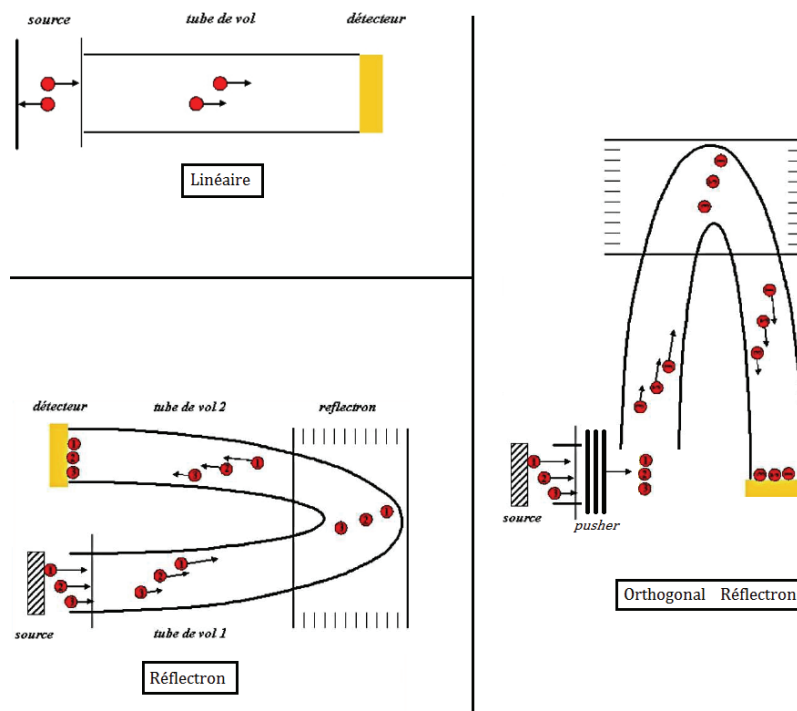


Figure III-12 Géométries d'analyseurs à temps de vol

Pour pallier ces limitations et ainsi améliorer la résolution, deux technologies ont été développées et mises en place par les constructeurs :

- un accélérateur orthogonal (ou « pusher ») :

Il s'agit d'un élément permettant le regroupement des ions en paquets à l'entrée du tube de vol. En effet, la source ESI générant des ions de façon continue, il est alors impossible de fixer un temps initial de référence ($t=0$) propre à chaque ion et marquant l'introduction de celui-ci dans le tube de vol. Cet élément permet aux ions d'avoir la même énergie cinétique initiale. Ainsi la séparation des ions est basée uniquement sur leur masse moléculaire et leur charge.

- un réflectron (miroir ou réflecteur électrostatique) :

Il s'agit d'un miroir électrostatique qui impose un champ électrique de direction opposé à celle du champ accélérateur initial, et donc du mouvement des ions. Ce dispositif permet donc de compenser les différences d'énergies potentielles pouvant exister entre des ions de même rapport m/z , par une différence de longueur de parcours au sein même du réflectron, afin de leur permettre

d'arriver ensemble au détecteur. Le réflectron permet donc de normaliser les éventuelles différences d'énergies initiales et donc d'améliorer la résolution.

3.4.3. Séparation par chromatographie en phase liquide

La séparation est basée sur les conditions chromatographiques de l'analyse ciblée présentée dans le chapitre précédent. Ainsi, la séparation a été réalisée sur une colonne Kinetex Phenyl-Hexyl (100 x 2,1 mm, 2,6 μm) de marque Phenomenex (Le Pecq, France). Les phases mobiles sont : (A) solution aqueuse à 0,01% d'acide acétique et 0,04 mmol.L^{-1} d'acétate d'ammonium; et (B) MeOH. Le débit de phase mobile, en mode gradient, est de 0,4 mL.min^{-1} , la température du four est de 60 °C et le volume d'injection est de 2 μL . Le gradient utilisé est présenté dans le Tableau III-4.

Tableau III-4 Gradient appliqué pour l'analyse LC des extraits *in vitro* et *in vivo*

Temps (min)	Pourcentage de (A)	Pourcentage de (B)
0	95	5
5	95	5
50	10	90
55	95	5
60	95	5

3.4.4. Détection par spectrométrie de masse à haute résolution (QqToF)

L'introduction de l'échantillon se fait *via* une source d'ionisation par electrospray (ESI, Apollo), qui est reliée au système chromatographique.

L'ionisation est effectuée en mode positif et les paramètres optimaux pour le débit LC utilisé sont :

- voltage du capillaire à 4500 V
- température de source à 200 °C
- débit de gaz de désolvatation (azote) de 660 L.h^{-1}
- pression du gaz de nébulisation (azote) de 2,8 Bar

Une calibration externe du spectromètre de masse est réalisée avant chaque analyse à l'aide d'une solution de formiate de sodium (10 mL d'hydroxyde de sodium à 0,1 M +

10 μ L d'acide formique + 250 mL d'isopropanol). De plus, la calibration a également été réalisée en mode externe proche sur chaque échantillon, à la fin de l'analyse, par un système de valve et d'une seringue avec pompe, afin de corriger les données acquises.

Deux modes d'acquisition ont été utilisés :

- le mode ToF ou « full-scan » : dans ce cas le quadripôle n'est pas utilisé et consiste en un simple élément de transmission des ions. Pour ce mode, une méthode d'acquisition optimisée entre 50 et 1000 Da a été utilisée. De plus, une seconde analyse de type « full-scan » a été utilisée avec des plages réduites autour des masses probables des métabolites de chaque molécule mère afin d'améliorer la sensibilité.
- le mode QqToF ou MS/MS : dans ce cas le quadripôle est actif et permet de sélectionner des ions précurseurs et de les fragmenter. Les analyses MS/MS ont été réalisées à trois énergies de collision : 10, 20 et 30 eV.

La résolution du MicrOTOF Q II peut atteindre 7 000 sur un ion de m/z égale à 200 Da, et augmente avec le m/z . Sa précision en masse est de 0,001 % soit 5 ppm ou 1 mDa pour un ion de m/z égal à 200 Da (données constructeur).

3.4.5. Traitement des données

Le traitement des données a été réalisé avec le logiciel Data Analysis version 1.3 (Bruker Daltonics® GmbH). Les données acquises ont d'abord subi un prétraitement comprenant une calibration des spectres.

Analyses « full scan » - Mode ToF

Les analyses réalisées en mode « full scan » sont traitées en deux étapes, faisant intervenir deux fonctions du logiciel : la fonction « Extracted Ion Chromatogram » (EIC) et la fonction « Smart Formula » (SF).

L'EIC permet d'extraire un m/z à partir des données du chromatogramme initial, et de retracer son propre chromatogramme. Cette méthode permet donc de cibler les m/z des adduits des molécules déjà connues. Pour cela, le m/z de la molécule protonée $[M+H]^+$ (ou autres adduits) est extrait et son chromatogramme est généré avec une fenêtre de masse de 50 mDa. Si un pic apparaît, alors un composé de m/z correspondant au composé recherché est présent dans l'échantillon.

La fonction SmartFormula permet, quant à elle, de localiser dans le chromatogramme les massifs isotopiques particuliers que présentent les atomes tels que le chlore, le brome ou le soufre. Pour cela, les intensités des ions présents sur un tronçon du chromatogramme sont moyennées, ce dernier étant choisi par l'analyste.

L'utilisation de la fonction SmartFormula nécessite donc une pré-découpe du chromatogramme. Dans l'étude présentée, les tronçons correspondent à des segments de 0,2 min, c'est à dire une largeur moyenne de pic chromatographique. Afin de prendre en compte toutes les données du chromatogramme et de ne pas omettre d'ions, cette pré-découpe a été réalisée deux fois, en quinconce.

Les résultats obtenus avec cette fonction permettent d'obtenir une liste de m/z correspondant à de potentiels métabolites (car identifiés grâce à la présence d'atomes particuliers), et de générer des hypothèses de formules brutes correspondant à ces m/z .

Ces résultats sont accompagnés d'une précision, en ppm, qui représente l'écart par rapport à la masse monoisotopique théorique, ainsi que d'une valeur $mSigma$, qui représente la correspondance entre les profils isotopiques théorique et expérimental. La valeur $mSigma$ tient compte à la fois de l'écart des masses monoisotopiques et de celui des rapports d'intensités relatives des isotopes. Plus le score $mSigma$ est faible et plus la probabilité de correspondance est grande.

Ainsi, pour valider la correspondance entre les données expérimentales et théoriques, en dehors de l'utilisation d'étalons ou de données de fragmentations, les valeurs limites fixées par le constructeur pour ces deux paramètres sont de 5 ppm maximum pour la tolérance sur la valeur de m/z , et d'une valeur inférieure à 30 en ce qui concerne la valeur du $mSigma$ (mode ToF).

Cette fonction peut également servir pour confirmer ou générer des propositions de formules brutes correspondant à des composés dont l'EIC a préalablement été tracé.

Analyses de fragmentation – Mode QqToF

Les analyses MS/MS réalisées à trois énergies de collision permettent de déterminer, en comparant les spectres de fragmentation des échantillons avec ceux des contrôles, les fragments propres au métabolite supposé.

Puis une seconde comparaison est effectuée entre les fragments des métabolites suspectés et ceux obtenus pour les molécules mères. Pour cela, des analyses de fragmen-

tation sont réalisées sur les molécules mères dans les mêmes conditions que celles des extraits. En parallèle, et afin d'obtenir des indications quant à la structure des métabolites, la base de données MassBank, qui répertorie les spectres de fragmentation de nombreuses molécules chimiques, dont certains pesticides, et à diverses énergies de collisions, est utilisée.

MassBank est une base de données publique sur le web dans laquelle les scientifiques peuvent déposer et ainsi partager leurs données spectrales obtenues par spectrométrie de masse. (151)

Cet outil permet par exemple de rechercher un composé en particulier (par exemple le boscalide) et d'en obtenir les spectres de fragmentation obtenus à partir d'un ou plusieurs instruments et à une ou plusieurs énergies de collision. Les fragments de la base de donnée étant annotés, cela permet d'annoter également les fragments obtenus expérimentalement.

3.5. Quantification du boscalide et de ses métabolites dans les abeilles

3.5.1. Obtention des étalons analytiques

Des métabolites ont du être synthétisés par la société DiverChim SA (Roissy-en-France, France) : DIV1 (pureté >95%), DIV2 (pureté > 98%), DIV3 (pureté >99%), DIV4 (pureté >99%) et DIV5 (pureté >96%) (Figure III-13).

Une solution de stockage (20 mL) des six étalons a été préparée à une concentration de 1 000 mg.L⁻¹ dans de l'ACN et stockée à -18°C. Les solutions utilisées pour le développement de la séparation et des analyses de fragmentation ont été préparées par dilution de ces solutions de stockage dans de l'eau pure (Milli-Q®).

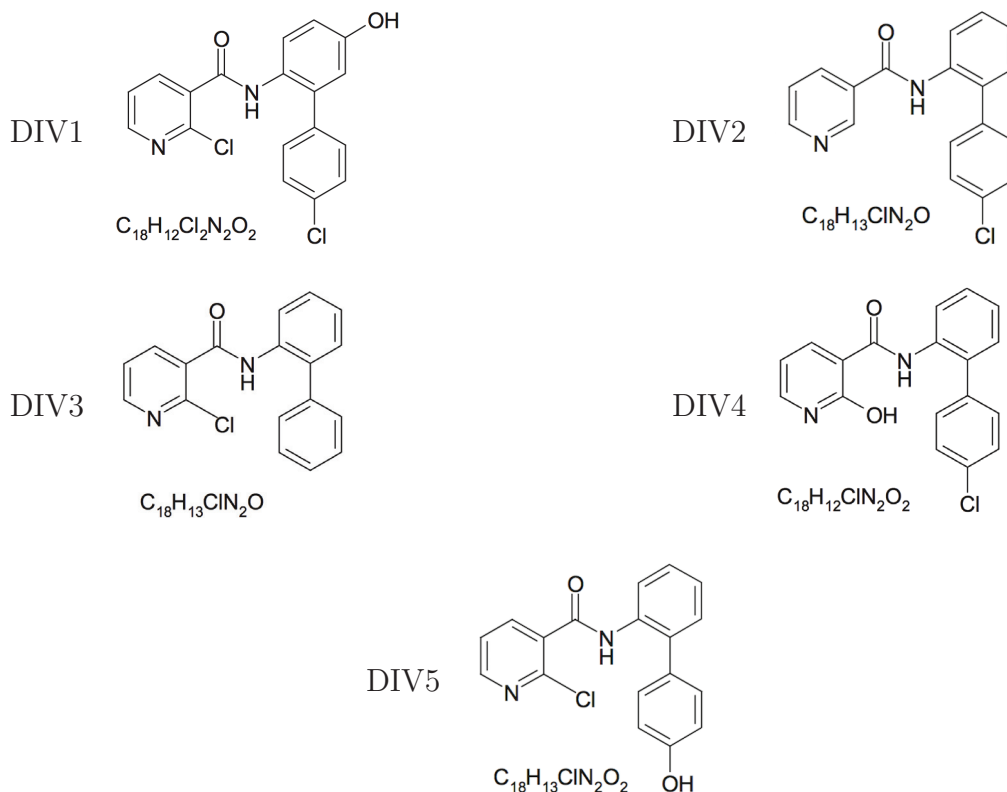


Figure III-13 Structures des métabolites synthétisés du boscalide

3.5.2. Préparation d'échantillon

La même méthode d'extraction (de type QuEChERS modifiée), que celle présentée dans le chapitre précédent pour l'analyse des abeilles (3.5.1) a été utilisée pour extraire à la fois le pesticide parent et ses métabolites.

3.5.3. Séparation par chromatographie en phase liquide

La séparation chromatographique a été réalisée à l'aide du système H-Class UPLC system Waters (Saint Quentin en Yvelines, France) et avec les mêmes paramètres : colonne, phases mobiles, débit et température de four. Le volume d'injection est de 5 μ L. Le gradient appliqué est : de 5% à 90% de (B) en 7 min puis 100% de (B) pendant 2 min. Enfin, un équilibrage de la colonne dans les conditions initiales est effectué pendant 2 min.

3.5.4. Détection par spectrométrie de masse triple quadripôle (QqQ)

Le système chromatographique est relié au système de détection Waters Xevo TQ-S, spectromètre de masse triple quadripôle. L'ionisation ESI est réalisée en mode positif avec les paramètres suivant :

- tension de capillaire : 3 200 V
- température de désolvatation : 450 °C
- température de source : 150 °C
- débit de gaz de désolvatation (N_2) : 900 L/h
- débit de gaz de nébulisation (N_2) : 150 L/h

Pour chaque composé analysé, deux transitions MRM optimales ont été choisies suite à leur infusion directe dans le spectromètre de masse et à l'utilisation de la fonction Intellistart™ qui sélectionne automatiquement les valeurs m/z des ions précurseurs et fils. Ainsi, la transition présentant la plus grande intensité (MRM1) est utilisée pour la quantification et la seconde (MRM2), moins intense, est utilisée pour la confirmation. Le Tableau III-5 reprend les différents paramètres optimums pour la détection du boscalide et de ses métabolites.

Tableau III-5 Temps de rétention, transitions de quantification (MRM1) et de confirmation (MRM2) et paramètres de source pour le boscalide et les cinq étalons synthétisés, par LC-QqQ

Composé	t_R (min)	Transitions	Tension de cône (V)	Energie de collision (eV)
Boscalide	6,5	MRM1 343 → 307	30	20
		MRM2 343 → 140	30	20
DIV1	5,8	MRM1 359 → 139	10	20
		MRM2 359 → 323	10	20
DIV2	6,4	MRM1 309 → 105	12	34
		MRM2 309 → 80	12	24
DIV3	6,3	MRM1 309 → 140	16	16
		MRM2 309 → 273	16	16
DIV4	6,8	MRM1 325 → 122	24	20
		MRM2 325 → 94	24	38
DIV5	5,5	MRM1 325 → 140	12	16
		MRM2 325 → 112	12	38

Limites de quantification

Les limites de quantification (LOQ) ont été calculées en dopant la matrice blanche avec un mélange de boscalide et de ses métabolites synthétisés pour obtenir les concentrations : 0,25 ; 1 ; 2 ; 5 ; 10 et 20 ng.g⁻¹. Les LOQ correspondent alors à la concentration pour laquelle un rapport signal sur bruit minimum de 10 est obtenu pour la première transition (MRM1). Tous les composés présentent une LOQ de 0,1 ng.g⁻¹.

4. Résultats et discussions

4.1. Stratégie d'étude: choix des conditions expérimentales

4.1.1. Pesticides étudiés et métabolites connus

Le choix des pesticides d'intérêt pour l'étude de la métabolisation chez l'abeille a tenu compte de plusieurs paramètres : des résultats issus des analyses ciblées des matrices pain d'abeille, abeille et cire d'abeille; de l'état des connaissances de la métabolisation de ces pesticides par l'abeille, et pour finir, de la sensibilité du détecteur pour les molécules mères. La décision a été prise de choisir au minimum une molécule de chacune des familles étudiées dans le chapitre précédent : néonicotinoïdes, pyréthri-noïdes et carboxamide.

Tout d'abord, les résultats issus des analyses ciblées ont montré que le boscalide, le thiaméthoxame et le thiaclopride sont régulièrement détectés. Ces molécules ont donc présenté un intérêt certain pour l'étude de leur métabolisation dans l'abeille. De plus, en ce qui concerne le boscalide, il a peu été étudié dans l'abeille et l'intérêt porté à cette molécule par les apiculteurs est grandissant.

Pour les pyréthri-noïdes, le choix s'est porté sur les molécules mères ayant les limites de détection les plus basses. Les deux molécules répondant le mieux avec le détecteur ToF sont la lambda-cyhalothrine et la deltaméthrine. Le choix s'est donc porté sur ces deux molécules, en faisant l'hypothèse que leurs métabolites auraient des réponses similaires vis-à-vis de la détection.

Les pesticides retenus pour l'étude de métabolisation sont donc le boscalide, le thiaméthoxame, le thiaclopride, la deltaméthrine et la lambda-cyhalothrine.

Afin de guider l'analyse et la recherche des métabolites de ces 5 pesticides au sein des abeilles, nous nous sommes intéressés aux propriétés physico-chimiques (Log P et masse molaire) de leurs métabolites déjà répertoriés dans la littérature. La connaissance de ces paramètres est utile pour vérifier l'adéquation de la colonne chromatographique (Log P) ou encore pour optimiser les paramètres de détection en masse (rapport m/z des métabolites $[M+H]^+$) (Figure III-14 et Figure III-15).

Le Tableau III-6 renseigne le nombre de métabolites déjà répertoriés (issus de la littérature) appartenant à chacune des molécules. Des renseignements sur ces métabolites (formule brute, masse monoisotopique, logP estimé et structure lorsque disponible) sont présentés en Annexe 3.

Tableau III-6 Nombre de métabolites connus répertoriés dans la littérature pour chacun des pesticides étudiés

Pesticides	Nombre de métabolites répertoriés	Origine des métabolites	Références
Boscalide	66	Métabolisme animal : rat, vache, chèvre, poule Métabolisme végétal : raisin, laitue, haricot Dégradation physico-chimique : photocatalyse, électrochimie, métabolisme du sol	(152–155)
Thiaméthoxame	31	Métabolisme animal : chèvre, poule Métabolisme végétal : Dégradation physico-chimique : hydrolyse, photolyse, métabolisme du sol	(156)
Thiaclopride	47	Métabolisme animal : chèvre, poule, rat Métabolisme végétal : pomme, tomate, coton Dégradation physico-chimique : hydrolyse, photolyse, métabolisme du sol	(157,158)
Deltaméthrine	10	Métabolisme animal : chèvre, poule, rat, vache Métabolisme végétal : coton, maïs, pomme, tomate Dégradation physico-chimique : hydrolyse, photolyse, métabolisme du sol	(159)
Lambda-cyhalothrine	13	Métabolisme animal : rat, poule, chèvre Métabolisme végétal : coton, soja, pomme, chou, blé Dégradation physico-chimique : hydrolyse, photolyse, métabolisme du sol	(160)

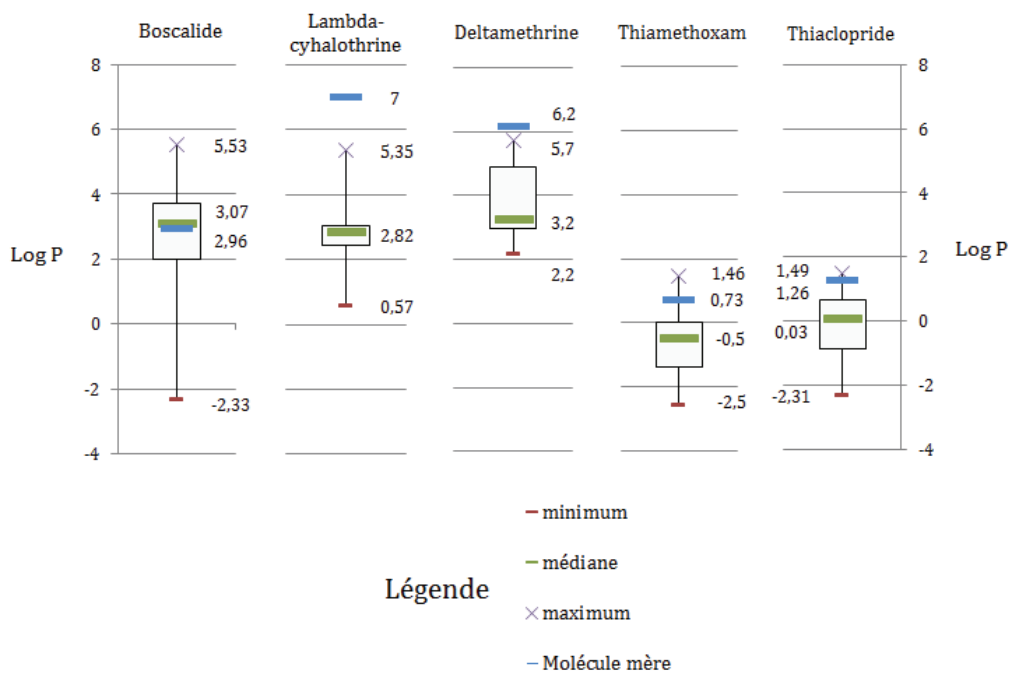


Figure III-14 Répartition des logP estimés des métabolites des 5 pesticide étudiés

Les graphes Figure III-14 révèlent que les métabolites des deux pyréthriinoïdes (lambda-cyhalothrine et deltaméthrine), ainsi que ceux du boscalide, présentent une majorité de logP supérieurs à 2 et sont donc considérés comme faiblement polaires. En revanche, les métabolites des deux néonicotinoïdes (thiaméthoxame et thioclopride), sont plutôt considérés comme polaires puisque la plupart d'entre eux présentent des logP inférieurs à 1.

La Figure III-15 montre, quant à elle, la répartition des rapport m/z des $[M+H]^+$ de ces métabolites par rapport à celle de la molécule mère (trait bleu).

Les rapports m/z de la plupart des métabolites semblent être proches de celles des molécules mères. Certains se détachent cependant en étant beaucoup plus élevées, signe d'une réaction métabolique de conjugaison (phase II).

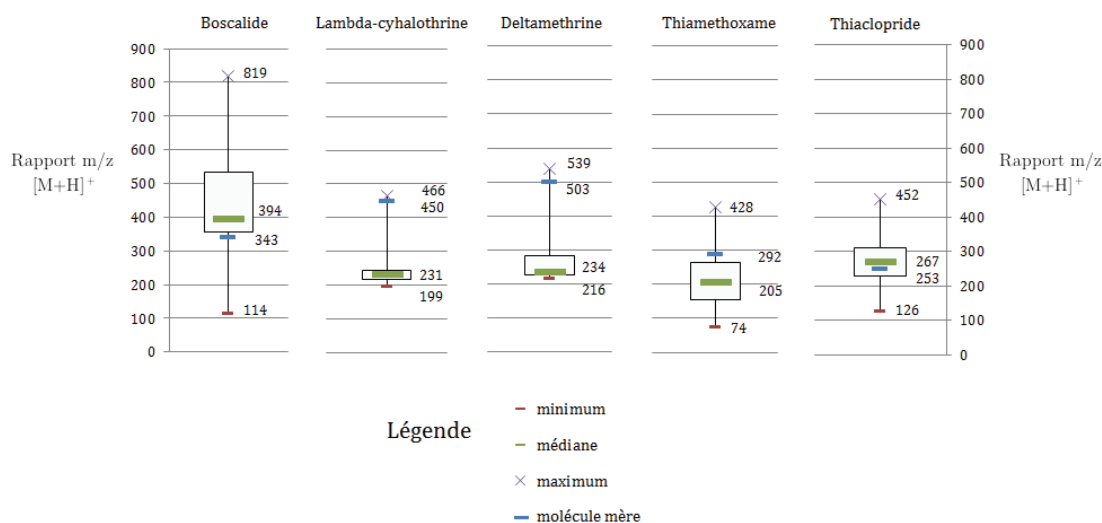


Figure III-15 Répartition des m/z $[M+H]^+$ des métabolites connus des pesticides étudiés

En conclusion, les $\log P$ indiquent que la séparation chromatographique des 5 pesticides étudiés dans ce chapitre peut être réalisée avec la même colonne que pour la séparation des 13 pesticides étudiés dans le chapitre précédent puisque la gamme de polarité est proche.

En ce qui concerne la répartition des rapports m/z , une méthode de masse pourra être mise en place pour chaque molécule mère afin de réduire la gamme de masse à détecter et ainsi augmenter la sensibilité vis-à-vis des métabolites.

4.1.2. Choix des concentrations

Les concentrations en pesticides ont été choisies en fonction du modèle étudié (*in vitro* ou *in vivo*).

Modèle *in vitro*

Les concentrations des molécules mères ont été choisies afin d'être dans des conditions optimales de sensibilités pour une détection par ToF. Des tests dans le solvant ont été réalisés afin de déterminer cette concentration. Pour cela, des solutions étalons ont été injectées à concentration croissante 0,01 ; 0,1 ; 0,5 ; 1 ; 5 et 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pour toutes les molécules. Finalement, le choix s'est porté sur une concentration de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ qui permettait d'avoir les intensités les plus élevées sans pour autant saturer le signal.

Modèle *in vivo*

Le modèle *in vivo* a pour but d'étudier le métabolisme des pesticides au sein des abeilles dans des conditions expérimentales contrôlées se rapprochant le plus des conditions réelles. Le choix des concentrations a donc pris en compte les doses d'utilisation à l'hectare des cinq composés étudiés. Cependant, l'enjeu était également de parvenir à récupérer suffisamment d'abeilles vivantes à l'issue des expériences pour être en mesure d'appliquer le protocole d'extraction qui nécessite 5 g d'abeille. Les taux de mortalité des abeilles après 24h, vis-à-vis de ces molécules, ont donc été pris en compte.

Plusieurs molécules avaient fait l'objet d'études éco-toxicologique au sein de l'équipe Abeilles et Environnement (INRA). Ces dernières ont notamment permis d'obtenir les courbes de dose/mortalité de plusieurs substances actives, dont le thiaméthoxame, le thiaclopride, la deltaméthrine et la lambda-cyhalothrine, ainsi que les courbes de mortalité/temps de plusieurs formulations commerciales dont le Flagship Pro-Syngenta (thiaméthoxame à DL50) et le Decis Protech-Bayer (deltaméthrine à DL30). Ces courbes de dose/mortalité et de mortalité/temps, présentées respectivement dans les Figure III-16 et Figure III-17, ont donc permis de choisir les doses de pesticides à pulvériser.

Les courbes Figure III-16 montrent que les pesticides induisent des taux de mortalités différents sur les abeilles. En effet, pour le thiaclopride, la mortalité des abeilles est induite avec des doses bien supérieures aux trois autres molécules présentées (environ 100 fois plus). Ainsi, la concentration en thiaclopride que l'on appliquera sera également supérieure.

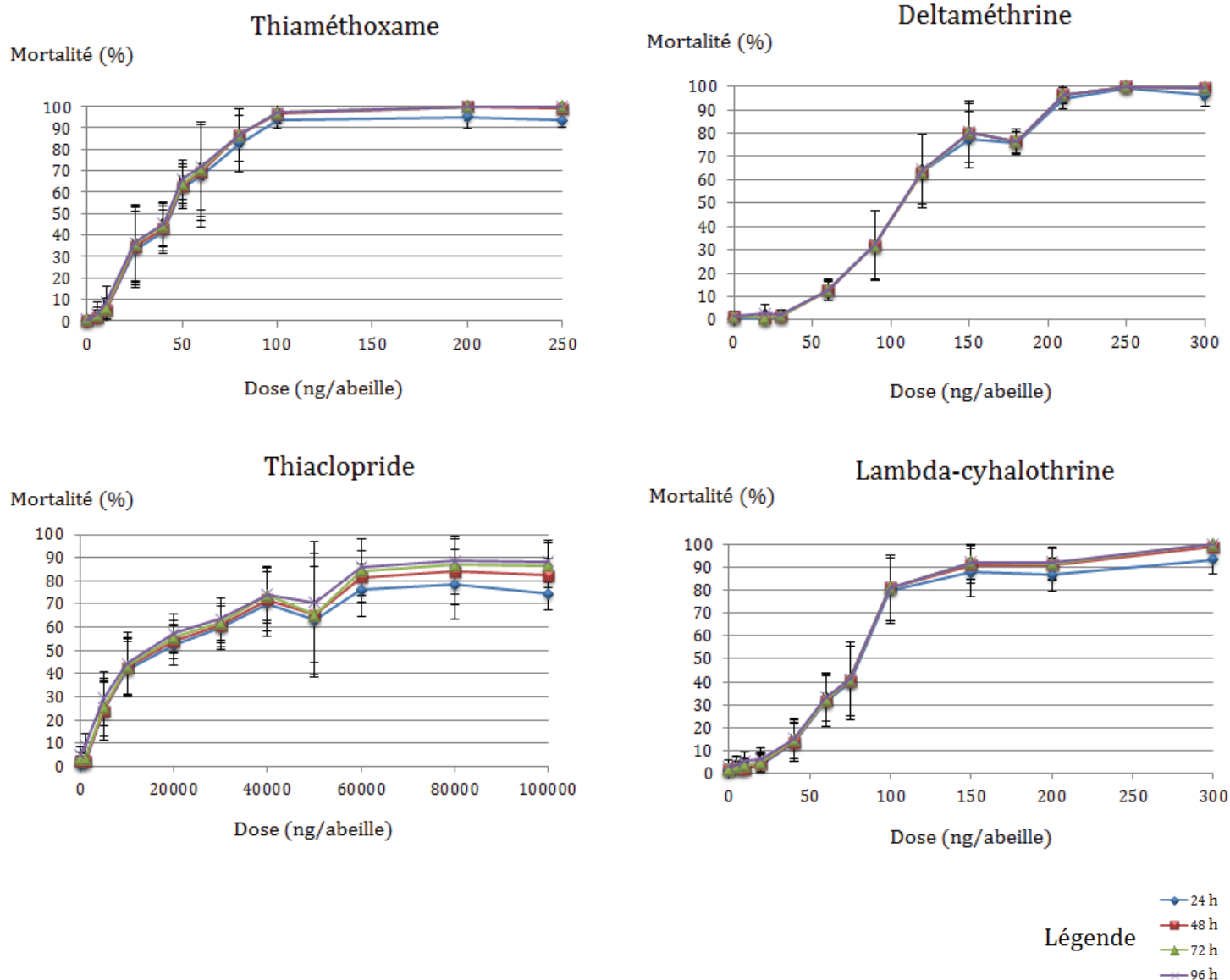


Figure III-16 Taux de mortalité des abeilles obtenus pour les substances actives : thiaméthoxame, thioclopride, deltaméthrine et lambda-cyhalothrine, d'après les travaux de l'équipe Abeilles et Environnement (UMR 406, INRA Avignon)

Les doses létales entraînant la mort de 50% des individus peuvent également être estimées à partir de ces graphes et aident à évaluer les doses à appliquer pour l'expérience *in vivo*. Voici les valeurs approximatives des DL50 pour les quatre molécules présentées dans la Figure III-16, accompagnées des valeurs annoncées dans la littérature (Tableau I-1) :

- Thiaméthoxame : DL50 \approx 50 ng/abeille soit $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ($0,24 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dans la littérature)

- Thiaclopride : DL50 \approx 10 500 ng/abeille soit 105 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (388,2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dans la littérature)
- Deltaméthrine : DL50 \approx 100 ng/abeille soit 1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (0,015 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dans la littérature)
- Lambda-cyhalothrine : DL50 \approx 80 ng/abeille soit 0,8 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (0,38 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dans la littérature)

Il est à noter que les valeurs des DL50 obtenues à l'issue de ces expériences ne correspondent pas tout à fait aux valeurs annoncées dans la littérature, pouvant être plus faibles (thiaclopride) ou plus élevées (thiaméthoxame, deltaméthrine, lambda-cyhalothrine).

Les graphes présentés dans la Figure III-17 ont été obtenus suite à des tests effectués à partir de formulations commerciales de thiaméthoxame (Flagship Pro - Syngenta) et de deltaméthrine (Decis Protech - Bayer), appliquées par pulvérisation (161).

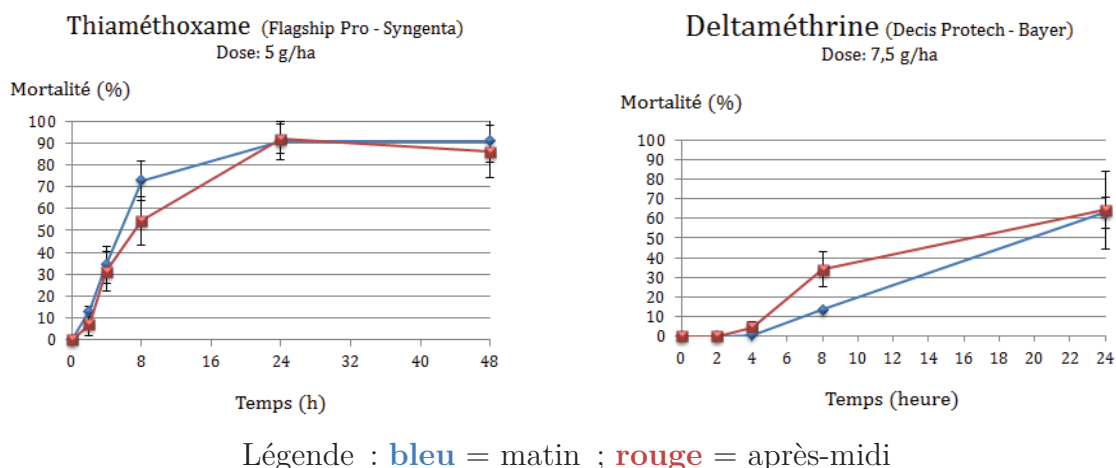


Figure III-17 Taux de mortalité des abeilles obtenus pour deux formulations commerciales : FlagshipPro Syngenta (thiaméthoxame), DecisProtech Bayer (deltaméthrine) – d'après (162)

Ces graphes représentent les taux de mortalité induits chez les abeilles par l'application d'une dose correspondant à la DL50 pour le thiaméthoxame (500 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$) et à la DL30 pour la deltaméthrine (750 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$), en fonction du temps. Les résultats obtenus pour 24h sont d'environ 90% de mortalité pour le thiaméthoxame (50% pour la molécule pure) et d'environ 60% de mortalité pour la deltaméthrine (30% pour la molécule pure). Les taux de mortalité de ces deux molécules sont donc bien plus élevés pour les formulations commerciales que pour les substances actives pures.

Afin de récupérer des quantités d'abeilles suffisantes, et au vu des différences observées entre les taux de mortalité obtenus avec des substances pures et avec les formulations commerciales, et, en tenant compte de la variabilité observée (modèle *in vivo*), une marge d'erreur a été appliquée.

Ainsi, un taux de mortalité de 80% sur 24h a été estimé pour le thiaméthoxame, la deltaméthrine et la lambda-cyhalothrine, qui présentent des toxicités importantes, alors qu'un taux de mortalité nul sur 24h a été estimé pour le thiaclopride. En ce qui concerne le boscalide, ne présentant théoriquement pas de toxicité importante pour les abeilles (76), un taux de mortalité nul sur 24h a également été estimé.

Finalement, en se basant à la fois sur les résultats présentés dans les graphes précédents, les doses d'utilisation des formulations commerciales ainsi que sur l'estimation des mortalités, les abeilles ont été soumises aux concentrations suivantes :

- Thiaméthoxame : 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
- Thiaclopride : 10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
- Boscalide : 33 000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
- Lambda-cyhalothrine : 0,65 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
- Deltaméthrine : 0,75 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

4.1.3. Échantillons et contrôles

Pour chaque modèle utilisé, *in vitro* et *in vivo*, les temps de métabolisation et les répliquats conditionnent le nombre d'échantillons générés. Les temps de métabolisation ont été choisis afin de permettre une dégradation suffisante de la molécule mère. Les contrôles ont, quant à eux, été utilisés afin de ne pas détecter de faux-positifs.

Modèle *in vitro*

Temps de métabolisation

Deux temps de métabolisation ont été déterminés en concertation avec les écotoxicologues de l'INRA (UMR 406, Avignon) qui avaient déjà observé, lors de précédentes expériences *in vitro*, de fortes diminutions de la concentration en molécule mère dès les premières heures. Ainsi, en plus du temps 0 (T0), des temps correspondant à 2h et 6h après la mise en contact ont été sélectionnés pour tous les pesticides étudiés.

Échantillons et contrôles

Deux types d'expériences *in vitro* ont été menées, afin d'accéder au maximum d'information sur la métabolisation des pesticides : métabolisme oxydatif, hydrolytique et conjugatif au glutathion.

L'étude du métabolisme oxydatif (de phase I), est réalisée à l'aide des extraits microsomaux. L'étude des métabolismes hydrolytique et conjugatif au glutathion sont, quant à eux, réalisés à partir des extraits cytoplasmiques auxquels a été ajouté (métabolisme conjugatif), ou non (métabolisme hydrolytique), le glutathion.

Plusieurs contrôles ont également été réalisés pour chaque type d'extrait et sont présentés dans le Tableau III-7. Certains extraits, dont le matériel biologique (fraction microsomale et fraction post-mitochondriale) a été désactivé par chauffage à 100 °C pendant 5 min et auxquels sont ajoutés les pesticides étudiés, constituent le premier contrôle. Ils permettent d'avoir un échantillon contrôle dans lequel le pesticide a subi les deux temps de métabolisation mais dont la potentielle dégradation n'est pas due à des réactions métaboliques. Le second contrôle correspond au matériel biologique auquel aucun pesticide n'a été ajouté aux deux temps de métabolisation (T2 et T6) ainsi qu'à T0.

Tableau III-7 Composition des extraits *in vitro* pour l'expérience de métabolisation

	Extraits cytoplasmiques		Extraits microsomaux
	AVEC glutathion	SANS glutathion	
Extraits de métabolisation T0, T2 et T6	Suspension cyto.	Suspension cyto.	Suspension micro.
	+ Pesticides	+ Pesticides	+ Pesticides
	+ Glutathion	+ Eau	+ Milieu de métabolisation
Extraits inactivés T0, T2 et T6	Suspension cyto. inactive	Suspension cyto. inactive	Suspension micro. inactive
	+ Pesticides	+ Pesticides	+ Pesticides
	+ Glutathion	+ Eau	+ Milieu de métabolisation
Extraits sans pesticides T0, T2 et T6	Suspension cyto.	Suspension cyto.	Suspension micro.
	+ Glutathion	+ Eau	+ Eau
	+ Eau		+ Milieu de métabolisation

Modèle *in vivo*

Temps de métabolisation

Le temps de métabolisation *in vivo* a été choisi à partir des cinétiques de dégradation obtenues par Y. Poquet (161) au cours de ses travaux au sein de l'équipe Abeille et Environnement, et présentées dans la Figure III-18 pour les molécules de thiaclopride, thiaméthoxame et deltaméthrine.

Ces graphes montrent qu'une forte diminution (80%) de la concentration en molécule mère est observée au cours des premières 24 heures, pour chacune des trois molécules. Compte tenu de ces résultats, des résultats des mortalités induites chez les abeilles présentées précédemment (4.1.2), il a été décidé d'effectuer les expériences de métabolisation sur une durée de 24h.

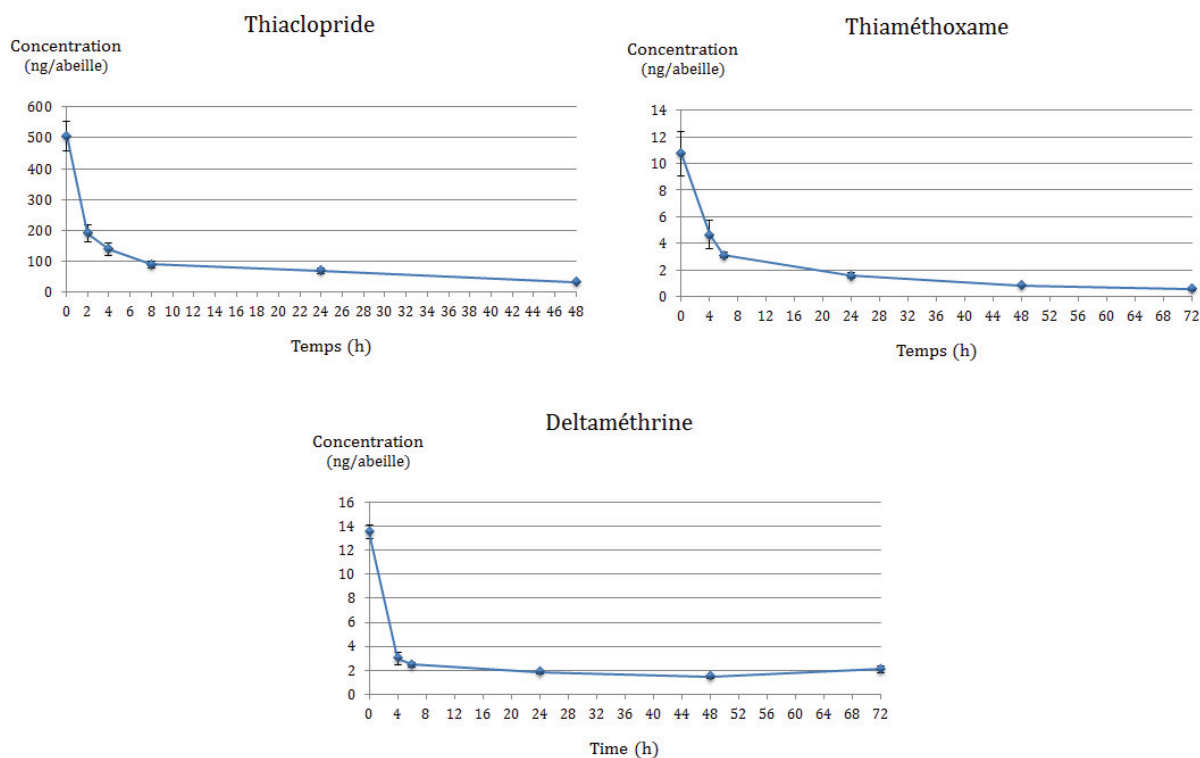


Figure III-18 Cinétiques de dégradation des substances actives dans l'abeille

Échantillons et contrôles

Plusieurs contrôles, exempts de pesticides, ont été réalisés. Le premier correspond aux abeilles congelées juste après leur prélèvement dans la ruche et leur endormissement. Le second correspond à des abeilles ayant subi l'étape de pulvérisation mais avec de l'eau distillée. Ce contrôle permet de reproduire le stress, et donc les changements physiologiques, subis par les abeilles au cours de la pulvérisation. Elles ont ensuite été, soit congelées immédiatement après la pulvérisation (T0), soit conservées (vivantes) à l'étuve pendant la durée de l'étude (T24). Tous les échantillons et contrôles *in vivo* ont été réalisés en duplicat. Un contrôle supplémentaire a consisté à vérifier l'absence de métabolites dans les solutions commerciales. Les échantillons et contrôles ayant été réalisés dans le cadre de l'étude de la métabolisation *in vivo* sont regroupés dans le Tableau III-8.

Tableau III-8 Composition des échantillons d'abeilles pour l'expérience de métabolisation *in vivo*

Nom du contrôle	Composition
Contrôle Pesticide T0	Solution de pulvérisation
Contrôle Pesticide T24	Solution de pulvérisation ayant subi une période de 24h dans une étuve à 28 °C
Contrôle Blanc ruche	abeilles congelées après le prélèvement dans la ruche
Contrôle Blanc T0	abeilles ayant subi une pulvérisation d'eau distillée puis une congélation juste après (T0)
Contrôle Blanc T24	abeilles ayant subi une pulvérisation d'eau distillée et une mise à l'étuve pendant 24h (T24) avant la congélation
Échantillon Pesticide T0	abeilles ayant subi la pulvérisation d'une molécule étudiée et une congélation immédiate (T0)
Échantillon Pesticide T24	abeilles ayant subi la pulvérisation d'une molécule étudiée et une mise à l'étuve pendant 24h, avant d'être congelées (T24)

Les chromatogrammes reconstitués (EIC) des molécules mères obtenus à l'issue de l'analyse de ces solutions sont présentés en Annexe 4. Des flèches indiquent les pics chromatographiques correspondant aux substances actives. Ces analyses révèlent la présence dans certaines solutions commerciales, comme par exemple celles de la deltaméthrine et du thiaméthoxame, de nombreux composés en plus des substances actives, correspondant certainement aux différents adjuvants présents dans les formulations.

Les solutions de pulvérisation ont également été analysées après 24 h à l'étuve afin de vérifier qu'elles ne se dégradent pas éliminant ainsi l'hypothèse selon laquelle les métabolites suspectés sont issus de dégradations physico-chimiques pendant les 24h à l'étuve.

4.1.4. Préparation d'échantillon

Modèle *in vitro*

Les extraits *in vitro* sont des échantillons peu complexes par rapport aux matrices apicoles étudiées dans le chapitre précédent. Cependant ils contiennent des protéines pouvant perturber la détection des métabolites recherchés. Pour cette raison, une préparation d'échantillon est nécessaire afin d'éliminer ces protéines.

Pour cela, la technique de précipitation par ajout de solvant organique (ACN) a été employée car cela ne dénature pas les composés recherchés, contrairement à l'ajout d'acide.

Modèle *in vivo*

L'extraction des métabolites dans les abeilles a été effectuée par la même extraction QuEChERS que celle reporté au chapitre précédent (3.5.1).

Cependant, dans le but de favoriser la détection des métabolites par ToF, deux paramètres ont été optimisés : la nature du solvant d'injection ainsi que la nature de la phase de purification.

Composition de l'extrait injecté

Le protocole d'origine consistait en l'injection d'un extrait (MeOH) dilué (x 5) avec de l'eau. Si cela permettait de se placer dans les conditions de début de gradient, cette dilution n'est pas bénéfique dans la problématique de recherche de métabolites puisqu'elle diminue les concentrations.

Des tests ont donc été effectués pour permettre la comparaison d'un extrait dilué (x 5), selon le protocole d'origine, avec un extrait non dilué (100% MeOH), ainsi qu'avec un extrait dilué (x 5) puis filtré afin d'enlever de potentiels résidus lipidiques. L'évaluation de ces différents paramètres est réalisée par enrichissement des abeilles avec une solution contenant les 5 pesticides étudiés, à une concentration de 10 mg.L⁻¹. Les chromatogrammes reconstitués des EIC des cinq pesticides étudiés sont présentés (Figure III-19) avec la même échelle d'intensité.

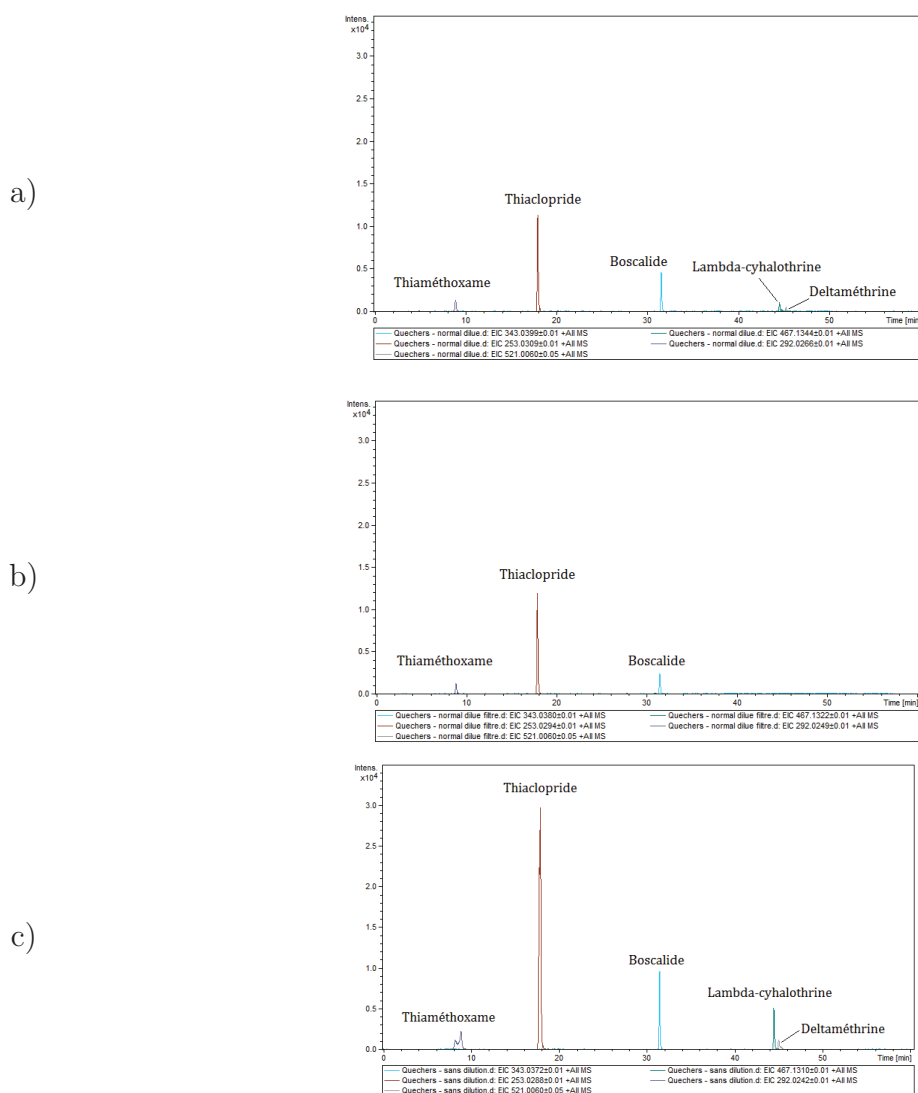


Figure III-19 Chromatogramme reconstitué avec les EIC des cinq pesticides étudiés d'un extrait obtenu par le protocole original d'extraction des abeilles (a) dilué par 5, (b) dilué par 5 puis filtré et (c) non dilué et non filtré

La comparaison des deux premiers chromatogrammes montre que l'étape de filtration entraîne une diminution d'intensité du pic chromatographique correspondant au boscalide, et une perte des deux pyréthriinoïdes. L'étape de filtration ne sera donc pas conservée pour les futures analyses.

La comparaison des chromatogrammes a) et c), montre que les cinq molécules sont bien présentes et que l'intensité des pics chromatographiques est doublée (thiaclopride, boscalide et deltaméthrine) voire quintuplée (lambda-cyhalothrine) lorsque l'extrait n'est pas dilué. En ce qui concerne le thiaméthoxame, l'intensité de son pic chromatographique a également augmenté, mais il présente un dédoublement en raison de la nature organique de l'extrait injecté et de la composition majoritairement aqueuse de la phase mobile du début de gradient.

L'objectif étant de privilégier la sensibilité afin de détecter les métabolites, le choix s'est porté sur l'injection de l'extrait non dilué dont la composition est organique (MeOH), qui permet un gain d'intensité jusqu'à un facteur 5 (lambda-cyhalothrine).

Nature de la phase de purification

Deux nouvelles phases de dSPE, Z-Sep et Z-Sep⁺, contenant du zirconium, ayant récemment été commercialisées pour améliorer la purification des extraits contenant des lipides, ont été évaluées.

La phase Z-Sep correspond à une phase de silice greffée avec des oxydes de zirconium. En revanche, la phase Z-Sep⁺ correspond à une phase de silice greffée à la fois avec des oxyde de zirconium et des chaînes alkyle C18. Les tests ont été réalisés en utilisant les phases Z-Sep et Z-Sep⁺ à la place de la phase PSA/C18 du protocole d'origine.

Les résultats issus de l'utilisation de ces deux phases ont donc été comparés à ceux issus de l'utilisation de la phase PSA/C18. La première différence observée est une coloration moins prononcée de l'extrait purifié avec la phase Z-Sep⁺ par rapport au deux autres (Figure III-20).

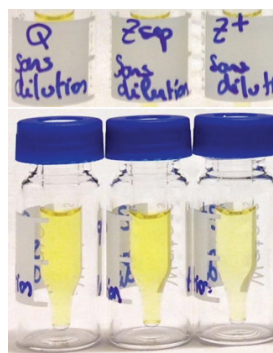


Figure III-20 Différences de coloration des extraits obtenus après extraction d'abeilles et purification par trois phases : PSA/C18 (Q), Z-sep et Z-sep⁺

La phase Z-Sep⁺ semble retenir plus de composés, notamment ceux à l'origine de la coloration jaune des extraits provenant peut-être du contact entre la cire et les pollens et/ou la propolis.

L'analyse de ces extraits par LC-QqQ a permis de comparer les aires des pics chromatographiques des cinq pesticides dans ces trois extraits (Figure III-21).

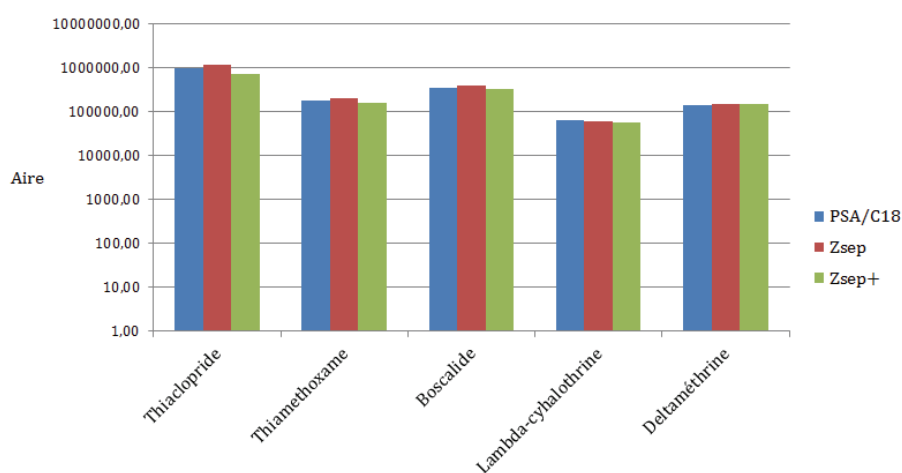


Figure III-21 Résultats (aires) de l'analyse des 5 pesticides après extraction des abeilles suivie d'une purification par les trois phases testées : PSA/C18, Z-Sep et Z-Sep⁺

Aucune différence significative n'étant observée, la phase PSA/C18 a été conservée.

4.1.5. Conditions chromatographiques

Colonne chromatographique

La colonne Phenyl-Hexyl, utilisée dans le cadre des analyses ciblées a permis de séparer un mélange de 13 pesticides présentant une large gamme de polarité, dont les logP sont compris entre 0,57 pour l'imidaclopride et 7,3 pour la bifenthrine, ainsi que les trois métabolites (5-hydroxy-imidaclopride, oléfine-imidaclopride et acide-6-chloronicotinique) de la molécule la plus polaire, l'imidaclopride. Par conséquent, il a semblé judicieux de l'utiliser pour la séparation des métabolites, puisque la majorité des logP des métabolites connus sont supérieurs à 0 (Figure III-14).

Volume d'injection

Dans le but d'améliorer la sensibilité, deux volumes d'injection, 5 et 10 μL , ont été évalués. La comparaison des résultats obtenus entre l'injection d'un volume de 5 μL ou de 10 μL , n'a révélé aucune différence significative d'intensité des ions des pesticides. De plus l'injection d'un volume de 10 μL entraîne une déformation des pics chromatographiques, notamment du thiaméthoxame, du thiaclopride et du boscalide, situés en début et milieu de gradient chromatographique. Finalement, pour ces raisons, le volume d'injection retenu est de 5 μL .

4.1.6. Détection et gamme de masse

Deux méthodes de détection par ToF sont utilisées. La première méthode est paramétrée pour une large gamme de m/z , allant de 50 à 1000 Da, permettant la détection à la fois des métabolites de phase I, dont le changement de masse est compris entre + 34 Da (ajout de 2 -OH) et - 160 Da (perte de 2 -Br, pour la deltaméthrine) par rapport à la molécule mère, et des métabolites de phase II, dont le changement de masse peut aller jusqu'à + 339 Da (réaction de conjugaison au glutathion).

La seconde méthode est, quant à elle, paramétrée pour la détection d'une gamme de m/z réduite, adaptées aux métabolites de phase I pour chaque molécule mère, notamment à l'aide des données de la Figure III-15. Le Tableau III-9 liste les domaines de masse réduits utilisés, accompagnés de leur amplitude, pour chaque molécule mère. Ceci permet d'une part de simplifier les chromatogrammes obtenus et d'autre part de réduire la taille des fichiers générés. La simplification des chromatogrammes permet également de faciliter le traitement des données.

Tableau III-9 Domaines de masse réduits du ToF

Molécule mère	Gamme de m/z réduite	Amplitude
Boscalide	340 – 560	220
Lambda-cyhalothrine	200 – 470	270
Deltaméthrine	200 – 540	340
Thiaméthoxame	150 – 270	120
Thiaclopride	220 – 320	100

4.1.7. Protocole de recherche des métabolites

La recherche des métabolites est réalisée à partir des analyses en mode full scan effectuées par LC-ToF, en mode positif, avec les gammes de masses larges (50 - 1000) et réduites (Tableau III-9).

Recherche de métabolites connus

La première étape du protocole de recherche des métabolites, décrit dans la Figure III-22, consiste à sélectionner les m/z des adduits des métabolites connus. L'étude a été menée en recherchant les adduits $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, et $[M+NH_4]^+$. Les deux premiers correspondent aux adduits les plus couramment formés en ionisation par électrospray en mode positif, et le troisième est favorisé par l'ajout d'acétate d'ammonium dans la phase mobile.

Chaque m/z est ensuite manuellement recherché en générant leurs EIC. Dans les échantillons T2 et T6 (extraits *in vitro*) et les échantillons T24 (extraits *in vivo*) où les pesticides ont subi la métabolisation, le m/z recherché est considéré présent lorsque l'EIC généré forme un ou plusieurs pic(s) chromatographique(s). Lorsqu'un pic est présent, sa formule brute est vérifiée, par la correspondance de son massif isotopique, et doit correspondre à celle du métabolite connu recherché. Si plusieurs pics chromatographiques sont présents, cette vérification est réalisée sur chacun des pics.

Les pics ainsi validés sont ensuite recherchés dans les contrôles. Si un pic est présent au même temps de rétention il est nécessaire de vérifier sa formule brute. Si celle-ci est identique, l'intensité du m/z de l'ion présent dans l'échantillon est alors comparée à celle de l'ion présent dans le contrôle. Si les intensités sont identiques, alors il peut s'agir, soit d'un composé matriciel endogène possédant le même m/z, soit d'un composé qui était présent dans la solution de pulvérisation (pour les extraits *in vivo*). En

revanche, si les intensités sont variables, alors l'hypothèse de la présence d'un métabolite formé pendant l'expérimentation peut être validée.

Si l'EIC ne révèle aucun pic au même temps de rétention que le pic précédemment suspecté, la suspicion de la présence du métabolite est renforcée.

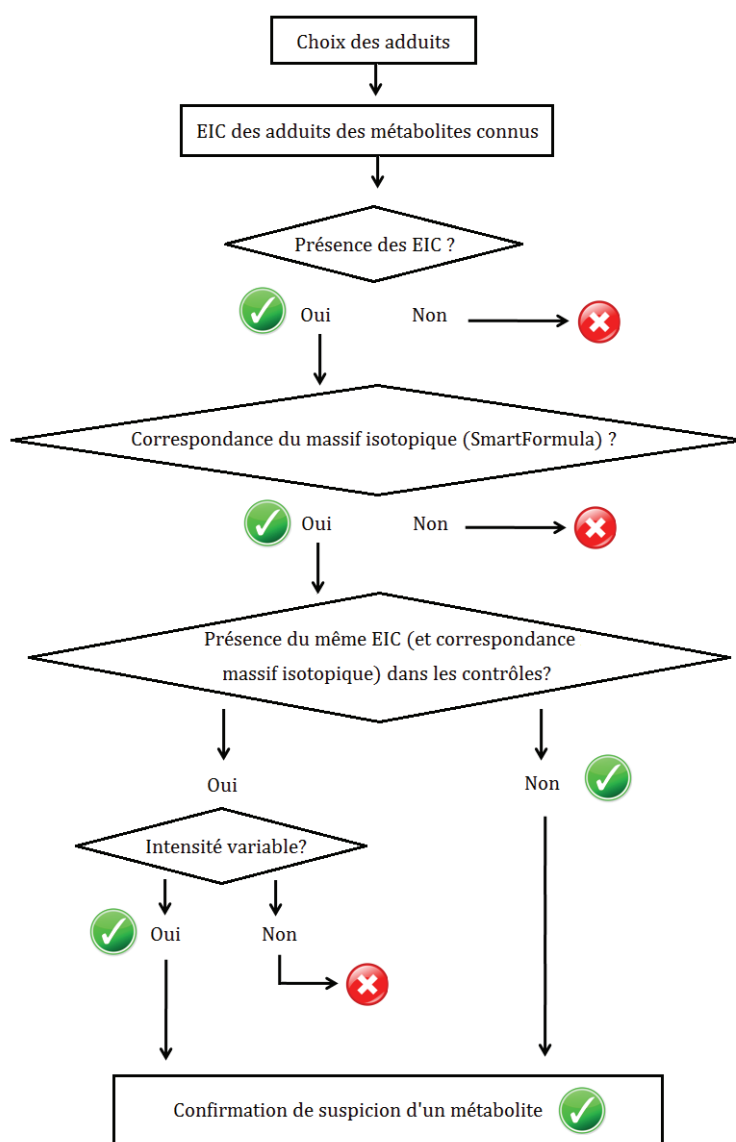


Figure III-22 Protocole de recherche des métabolites connus à partir des analyses LC-ToF

Recherche de métabolites chlorés, bromés et/ou soufrés, non répertoriés

La recherche par le massif isotopique est basée sur l'hypothèse de présence de certains atomes particuliers dans les métabolites, tels que le chlore (Cl), le brome (Br) ou encore le soufre (S) (Figure III-23). Ces atomes engendrent des massifs isotopiques très caractéristiques en spectrométrie de masse.

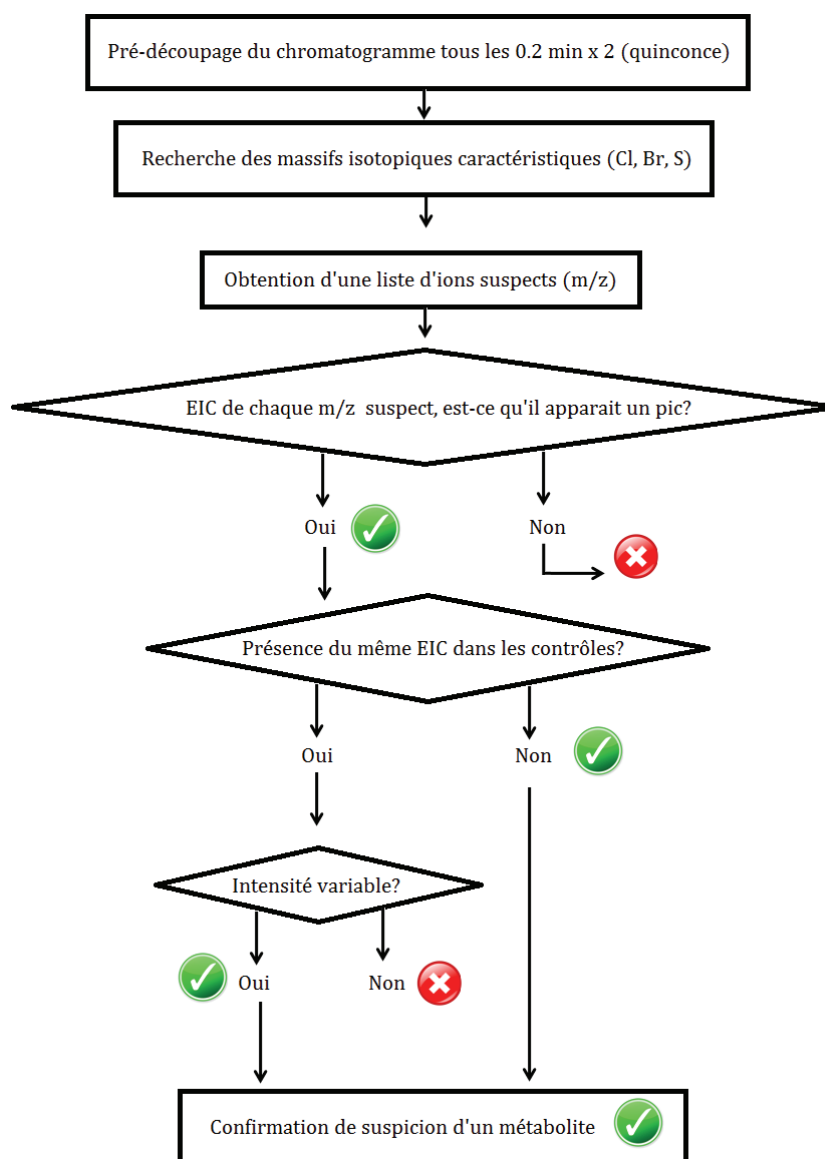


Figure III-23 Protocole de recherche de métabolites chlorés, bromés et/ou soufrés, non répertoriés, à partir des analyses LC-ToF

La recherche de ces massifs isotopiques caractéristiques est faite sur des segments de 0,2 min, et une liste d'ions suspects (m/z) accompagnés de leur temps de rétention est ainsi établie.

L'EIC de ces derniers est ensuite généré pour savoir s'ils correspondent bien à des pics chromatographiques. En effet, SmartFormula fonctionne en faisant la moyenne des intensités des ions présents dans le segment de 0,2 min, et cela peut parfois entraîner des faux-positifs. Dans le cas où l'EIC ne révèle aucun pic, le m/z est éliminé. Lorsqu'un pic est présent, une recherche de ce m/z est effectuée comme précédemment dans les différents contrôles, puis son intensité comparée le cas échéant.

Finalement, une liste de m/z suspectés d'être des métabolites est établie, avec un temps de rétention et une hypothèse de formule brute correspondante, accompagnée d'une erreur sur le m/z (en ppm) et d'un score de correspondance du profil isotopique (mSigma).

Les deux protocoles de recherche présentés ont été appliqués à chacun des modèles étudiés (*in vitro* et *in vivo*) et les résultats sont présentés respectivement dans les sections 4.2 et 4.3.

Chacune de ces sections fera état : dans un premier temps de la dégradation de la molécule mère entre les différents temps de métabolisation puis dans un second temps des résultats obtenus suite à la recherche des métabolites connus et des métabolites chlorés, bromés et/ou soufrés, non répertoriés.

4.2. Modèle *in vitro* : Recherche des métabolites et résultats

4.2.1. Diminution de la concentration de la molécule mère dans les extraits

La dégradation des molécules mères entre les temps T0, T2 et T6 a été évaluée par l'analyse des extraits *in vitro* par MS en mode MRM (Tableau III-10). Aucune différence significative des intensités en molécules mères n'est observée à T2, quelle que soit la molécule.

Tableau III-10 Variation (%) d'intensité des ions parents des pesticides étudiés, dans les extraits *in vitro* entre les temps T0 et T6, par LC-QqQ

Molécule mère	Fractions cellulaires								
	Microsomale			Cytoplasmique					
	RSD (%)		Variation (%)	Sans glutathion			Avec glutathion		
	T0	T6		T0	T6		T0	T6	
Boscalide	5	4	+37	0	66	-34	5	5	-90
Lambda-cyhalothrine	21	4	-23	111	36	-81	1	12	-95
Thiaclopride	3	19	+1	4	8	-1	7	2	-1
Deltaméthrine	9	3	-3	3	6	-1	7	7	+3
Thiaméthoxame	2	2	+2	4	1	-3	2	3	+8

Entre les temps T0 et T6, seules deux molécules, le boscalide et la lambda-cyhalothrine, présentent une diminution d'intensité. Seules les expériences faisant intervenir les extraits cytoplasmiques ont permis une dégradation de la molécule mère avec une diminution pouvant aller jusqu'à 90% entre T0 et T6 pour le boscalide et jusqu'à 95% entre T0 et T6 pour la lambda-cyhalothrine, dans les extraits cytoplasmiques avec glutathion.

Il est à noter que les extraits cytoplasmiques sans glutathion présentent de fortes variations sur les trois réplicats : RSD de 66 % à T6 pour le boscalide, et RSD de 111 % à T0 et de 36 % à T6 pour la lambda-cyhalothrine. Les diminutions observées pour ces extraits, de -34 % pour le boscalide et -81 % pour la lambda-cyhalothrine ne sont donc pas significatives. Ces extraits ne sont donc pas pris en compte.

Globalement, ces premières constatations indiquent que les expériences *in vitro* pourraient avoir été compromises. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer ces résultats qui indiquent une faible, voire une absence, de métabolisation :

- Problème d'intégrité du système biologique au sein des extraits :

Aucun des extraits microsomaux n'a présenté de diminution d'intensité de la molécule mère entre les temps T0 et T6. L'hypothèse la plus probable est que le matériel biologique a été endommagé et que les extraits microsomaux n'ont pas été en mesure de dégrader les pesticides. Ceci peut être dû, entre autres, à un problème survenu lors

de l'obtention de la fraction microsomale qui nécessite une préparation délicate s'effectuant à une température constante d'environ 0°C. Il s'agirait donc d'un problème survenu lors de la préparation des extraits qui aurait causé une dégradation des composés majeurs de la métabolisation, entraînant par exemple des problèmes d'intégrité des microsomes et des CYP450.

- Solutions mères : substance active ou formulation commerciale

Les solutions mère de pesticide devant être préparées dans de l'eau avec un faible pourcentage de solvant organique, il a donc été impossible de préparer les solutions de pyréthrinoïdes, ceux-ci ne se dissolvant pas dans l'eau. Les solutions ont finalement été faites à partir des préparations commerciales pour ces deux composés. Or, ces formulations contiennent des adjuvants qui pourraient éventuellement être à l'origine d'une inhibition des réactions métaboliques au sein des fractions cellulaires. Il apparaît cependant que la lambda-cyhalothrine ait été métabolisée dans l'extrait cytoplasmique. Les adjuvants n'étant pas les mêmes dans les préparations commerciales (Annexe 4) cette hypothèse d'inhibition pourrait expliquer l'absence de métabolisation de la deltaméthrine.

- Pourcentage de solvant organique

Les solutions mères de boscalide, de thiaméthoxame et de thiaclopride ont été préparées avec les substances actives dans de l'eau additionnée de solvant organique (acétone) pour améliorer leur dissolution, 1% pour le boscalide et le thiaclopride, et 2% pour le thiaméthoxame. Or, la présence de solvant organique peut interférer avec l'activité métabolique *in vitro* de certaines enzymes (163). Ceci pourrait donc être à l'origine de l'absence de réactions métaboliques pour ces deux néonicotinoïdes. En revanche, la présence de solvant n'a apparemment pas empêché la métabolisation du boscalide.

Il est cependant difficile de privilégier l'une des hypothèses émises ci-dessus. En effet, ces cinq pesticides possédant des propriétés intrinsèques différentes, il est fort probable que leur devenir au sein d'un extrait *in vitro* le soit également.

Une précaution aurait été d'effectuer des contrôles de métabolisation. Ces derniers sont généralement effectués pour une molécule témoin, dont le métabolisme dans les différentes fractions cellulaires utilisées est connu.

Finalement, seules deux molécules (boscalide et lambda-cyhalothrine) sur les cinq étudiées ont montré des dégradations significatives entre les temps T0 et T6. Pour ces deux molécules, seuls les extraits cytoplasmiques avec glutathion seront analysés par LC-ToF pour la recherche de métabolites.

4.2.2. Recherche des métabolites connus

Les métabolites connus ont été recherchés selon le protocole présenté dans la Figure III-22, à partir de la recherche des m/z correspondant aux adduits des métabolites répertoriés. Au cours de la recherche de ces métabolites, deux cas de figure se sont présentés :

- Le m/z correspond à un (des) pic(s) chromatographique(s) mais est également présent(s) dans les contrôles à des intensités équivalentes
- Le m/z correspond à un pic chromatographique qui est absent des contrôles, mais dont le massif isotopique ne correspond pas à la formule brute du métabolite recherché

À l'issue de cette recherche, aucun métabolite n'a pu être détecté.

4.2.3. Recherche des métabolites chlorés, bromés et/ou soufrés, non répertoriés

La recherche des profils isotopiques particuliers, correspondants aux atomes de chlore et de brome (présents dans les molécules mères) et de soufre (présent dans le glutathion), a été menée sur les extraits.

Selon le protocole présenté Figure III-23, les résultats issus de cette recherche ont également été infructueux et n'ont pas permis de faire ressortir des m/z correspondant à de potentiels métabolites, qu'ils soient ou non conjugués au glutathion. Les cas de figures rencontrés lors de cette recherche ont été les mêmes que ceux rencontrés lors de la recherche de m/z ciblés.

Finalement, au vu des résultats des analyses des extraits *in vitro*, et puisqu'aucun métabolite connu ou nouveau n'a été détecté, une hypothèse serait que les extraits injectés n'étaient pas assez concentrés. Afin de favoriser la détection des composés d'intérêt, un volume plus important d'extrait (3 mL au lieu de 300 μL) a été utilisé et le surnageant obtenu à l'issue de la précipitation a été concentré sous un filet d'azote, à température ambiante, jusqu'à l'obtention d'un volume de 200 μL . Cependant, les analyses réalisées sur ces extraits concentrés n'ont pas non plus permis de détecter de métabolites, quel que soit le protocole de recherche utilisé.

D'autres hypothèses sont envisageables pour expliquer l'absence de détection de métabolites connu ou nouveau.

La première serait la présence de composés endogènes présents dans le surnageant issu de l'étape de précipitation des protéines, qui pourraient être à l'origine d'une suppression de signal et abaisser la sensibilité de détection des métabolites (141).

La seconde hypothèse est que les protocoles de recherche mis en place ne permettent pas de détecter les métabolites formés. En effet, le protocole utilisé pour la recherche des métabolites chlorés, bromés et/ou soufrés est basé sur l'hypothèse selon laquelle les métabolites contiennent ces atomes. Il ne permet donc pas de révéler les métabolites qui n'en contiennent plus à l'issue des réactions de biotransformation. Or cette possibilité est envisageable puisque, comme le montre la liste des réactions de biotransformations (Annexe 2), plusieurs de ces réactions consistent en la perte de l'halogène.

Des conditions analytiques non adaptées constituent la troisième hypothèse. En effet, il est possible que les métabolites soient analysables uniquement *via* une ionisation en mode négatif, ou bien qu'ils ne soient que très peu ou pas ionisés dans nos conditions.

Les extraits *in vitro* n'ayant pas permis de déceler de métabolites, c'est donc avec les extraits *in vivo* que les recherches se sont poursuivies.

4.3.Modèle *in vivo* : Recherche des métabolites et résultats

4.3.1.Diminution de la concentration de la molécule mère dans les extraits

De la même manière que pour les extraits *in vitro*, la dégradation de la molécule mère a été évaluée afin de vérifier sa métabolisation.

Les intensités des ions des molécules mères au temps T0 ont donc été comparées aux intensités obtenues au temps T24. Les résultats sont présentés en terme de pourcentage de diminution entre ces deux temps dans le Tableau III-11.

Tableau III-11 Diminution (%) d'intensité des ions parents dans les extraits *in vivo* entre les temps T0 et T24 par LC-ToF

Molécule mère	Diminution entre T0 et T24 (%)
Boscalide	31
Lambda-cyhalothrine	66
Deltaméthrine	51
Thiaméthoxame	75
Thiaclopride	56

Tous les ions des molécules mères présentent une diminution d'intensité supérieure à 50% (sauf le boscalide : 31 % seulement), impliquant une dégradation lors du contact avec les abeilles. L'ensemble des échantillons seront donc soumis aux protocoles de recherches des métabolites connus et des métabolites chlorés, bromés et/ou soufrés.

4.3.2. Recherche des métabolites connus

La recherche de métabolites connus (Figure III-22), a permis la détection de plusieurs m/z remplissant les conditions de correspondance requises.

Ainsi, deux m/z sont positifs pour le boscalide et deux autres pour le thiaclopride. Le Tableau III-12 présente l'ensemble de ces résultats (m/z du métabolite, temps de rétention, formule brute, adduit).

Tableau III-12 Liste des métabolites connus détectés dans les échantillons *in vivo* (T24)

Molécule mère	Métabolite m/z (Da)	t _R (min)	Formule brute	Adduit
Boscalide	359,03	25,4	C ₁₈ H ₁₃ Cl ₂ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺
		26,5		
		28,2		
		29,6		
	375,03	24,3	C ₁₈ H ₁₃ Cl ₂ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺
Thiaclopride	237,05	13,0	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ O	[M+H] ⁺
		269,02	15,0	C ₁₁ H ₁₄ ClN ₄ O ₂

Les paragraphes suivants présentent, pour chaque métabolite suspecté :

- la recherche du m/z du métabolite suspecté dans les extraits à T24 et les différents contrôles (T0 blanc ruche, solution de pulvérisation, T0 pesticide, et T24 blanc ruche).
- les spectres de masse du pic correspondant à T0 et à T24, tous deux ayant subi la pulvérisation de la solution contenant la molécule mère, pour en comparer les intensités. Les flèches rouges indiquent le massif isotopique. L'intensité de l'ion parent est indiqué dans un encadré rouge au dessous du spectre de masse pour faciliter la comparaison entre les extraits T0 et T24.

Métabolites suspectés du boscalide

Deux m/z sont suspectés de correspondre à des métabolites du boscalide. Le premier, $m/z = 359,03$ Da, correspond à quatre pics chromatographiques, et le second, $m/z = 375,03$ Da, à un pic chromatographique. Afin de faciliter la lecture de cette partie, ces métabolites seront nommés « BoscaMet359Px » (avec $x =$ numéro du pic chromatographique, donc de 1 à 4) et « BoscaMet375 ».

m/z 359,03 Da

La masse 359,03 Da correspond à l'adduit $[M+H]^+$ de la molécule $C_{18}H_{12}Cl_2N_2O_2$ qui est un produit d'oxydation du boscalide. Il est probablement obtenu par ajout d'un groupement -OH sur le boscalide, pouvant, à priori, avoir lieu sur l'un des trois cycles (Figure III-24).

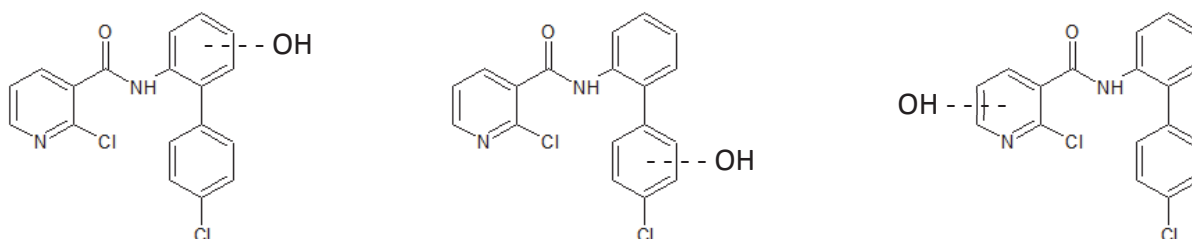


Figure III-24 Structures possibles des potentiels métabolites du boscalide BoscaMet359Px m/z 359,03 Da

La Figure III-25 présente le chromatogramme de l'EIC du m/z 359,03 Da dans les différents extraits analysés (T24 et contrôles), avec les temps de rétention correspondant.

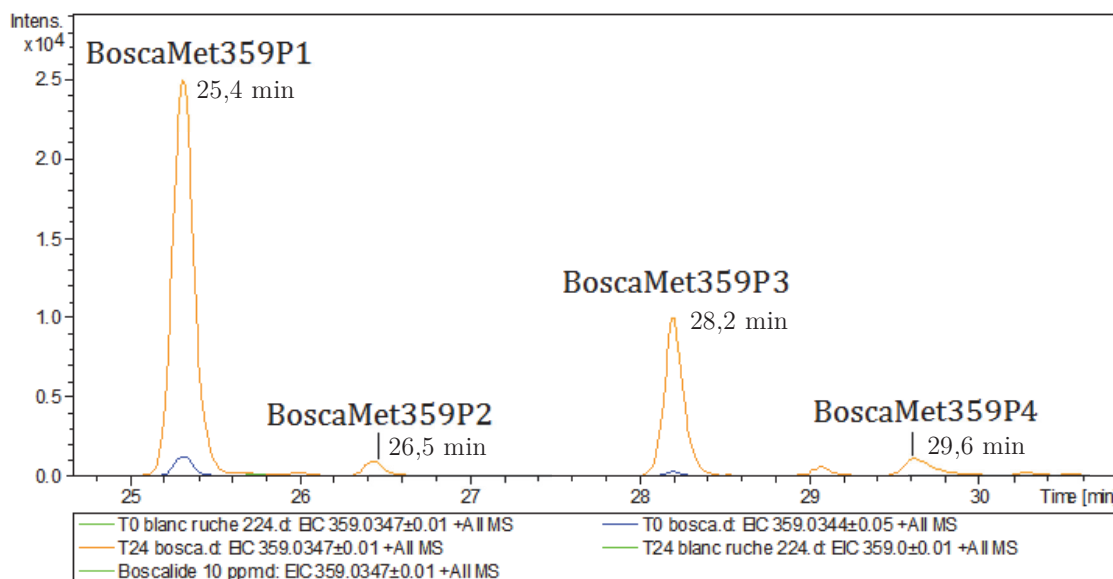


Figure III-25 EIC de l'adduit $[M+H]^+$ du composé $C_{18}H_{12}Cl_2N_2O_2$, m/z 359,03 Da dans les différents extraits

La Figure III-26 présente les spectres de masse des quatre pics (P1 à P4) ayant le même rapport m/z 359,03 Da dans les extraits T0 et T24.

La comparaison des spectres de masse conduit aux interprétations et conclusions suivantes :

- BoscaMet359P1

Le composé est présent à la fois dans le T0 et dans le T24. Cependant, l'intensité des ions dans le T0 est environ 15 fois plus faible (1500 coups) que dans le T24 ($2,5 \times 10^4$ coups), ce qui confirme l'hypothèse de la formation de ce métabolite.

- BoscaMet359P2

Le composé recherché est présent uniquement dans l'échantillon T24. Cependant son intensité est faible, de l'ordre de 1000 coups.

- BoscaMet359P3

Ce composé est présent à T0 et T24 mais l'intensité des ions est 45 fois plus importante dans le T24 ($0,9 \times 10^4$ coups) que dans le T0 (200 coups).

- BoscaMet359P4

De la même manière que précédemment, le quatrième pic présente des intensités plus élevées dans le T24 (1000 coups) que dans le T0 (150 coups).

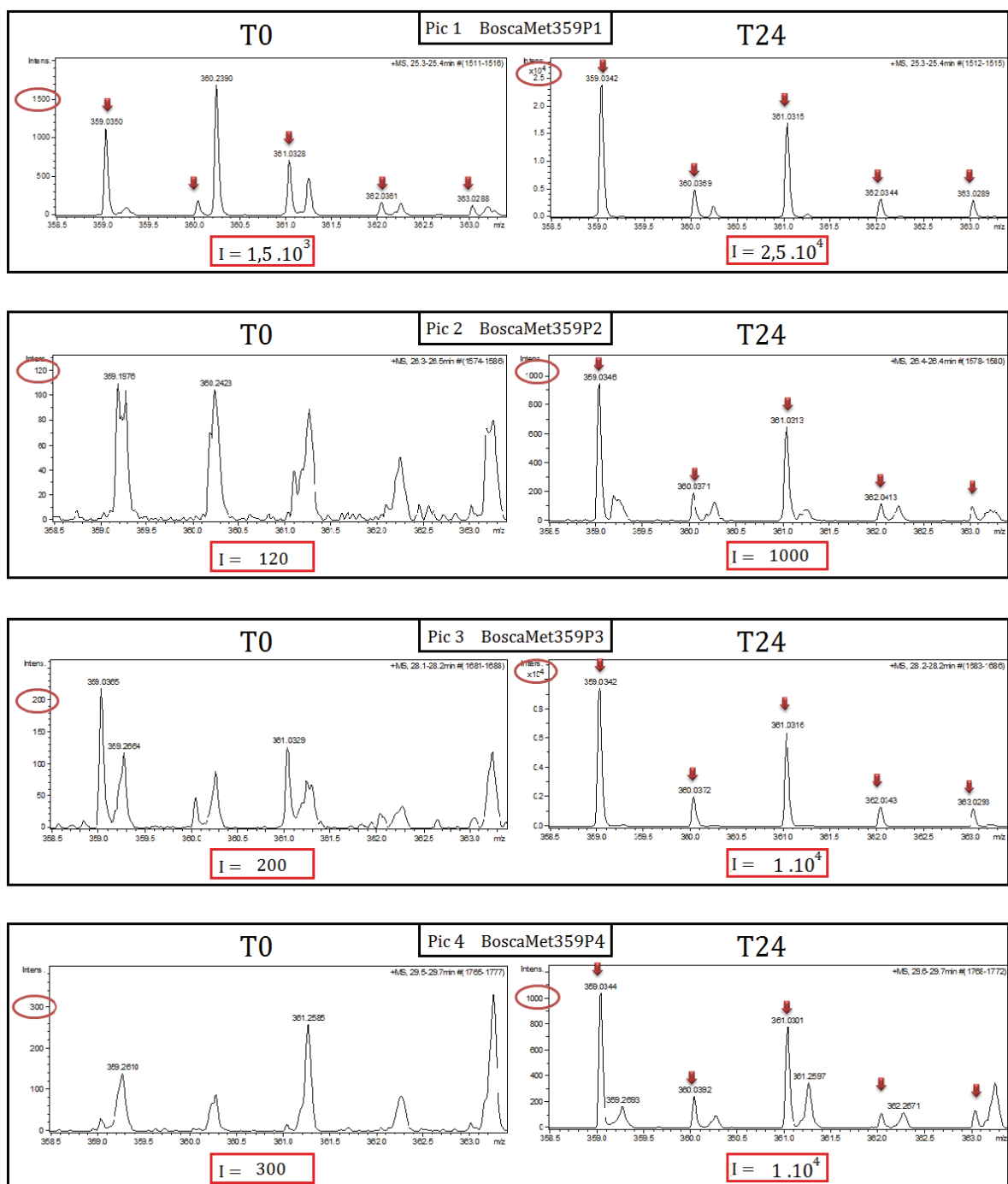


Figure III-26 Comparaison des spectres de masse à T0 et T24 des quatre pics chromatographiques (P1 à P4) de m/z 359,03 Da

Finalement, 2 des 4 pics ayant le rapport m/z 359,03 Da ont pu être validés comme correspondant au métabolite recherché, $C_{18}H_{12}Cl_2N_2O_2$ (erreur en masse < 5 ppm et correspondance du profil isotopique $mSigma < 30$). Voici les scores obtenus :

- BoscaMet359P1 :
 - o erreur en masse : -4,7 ppm
 - o $mSigma$: 19,7
- BoscaMet359P3 :
 - o erreur en masse : -4,5 ppm
 - o $mSigma$: 16,4 $mSigma$

En revanche, les signaux correspondant à BoscaMet359P2 et BoscaMet359P4 étaient de trop faibles intensités avec des paramètres d'erreur et de $mSigma$ respectivement de -3,6 ppm et 76,5 $mSigma$, et de 1,1 ppm et 44 $mSigma$. En effet, plus les intensités sont faibles et plus les variations entre le massif isotopique expérimental et théorique sont élevées, ce qui entrainera alors une augmentation de la valeur $mSigma$.

m/z 375,03 Da

La masse 375,03 Da correspond à l'adduit $[M+H]^+$ de la molécule $C_{18}H_{12}Cl_2N_2O_3$ qui est un produit d'oxydation du boscalide . Il est probablement obtenu par ajout de deux groupements -OH sur le boscalide (Figure III-27).

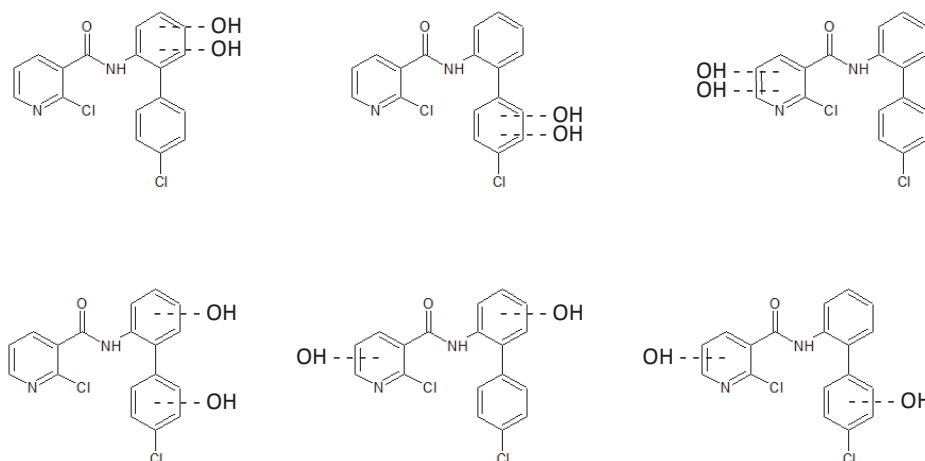


Figure III-27 Structures possibles du potentiel métabolite du boscalide : BoscaMet375 (m/z 375,03 Da)

Dans l'échantillon d'abeille soumis à la solution de pulvérisation (« T24 bosca »), un seul pic chromatographique correspond au rapport m/z 375,03 Da (24,3 min), représenté par le tracé orange, et correspondant à l'adduit $[M+H]^+$ de la molécule de formule brute $C_{18}H_{12}Cl_2N_2O_3$.

Deux autres ions, dont les m/z correspondent à quatre composés répertoriés comme métabolites du boscalide dans la littérature (m/z 309,08 Da, $C_{18}H_{13}ClN_2O$; et m/z 325,07 Da, $C_{18}H_{13}ClN_2O_2$), ont été détectés.

Le premier composé (m/z 309,08 Da, $C_{18}H_{13}ClN_2O$, t_R 28,3 min) correspondrait au boscalide ayant perdu un atome de chlore.

Le second (m/z 325,07 Da, $C_{18}H_{13}ClN_2O_2$, t_R 31,9 min) correspondrait, quant à lui, au boscalide dont l'un des atomes de chlore aurait été substitué par un groupement hydroxyle.

Les deux composés étaient présents dans la solution de pulvérisation et peuvent être considérés comme des marqueurs d'exposition au boscalide.

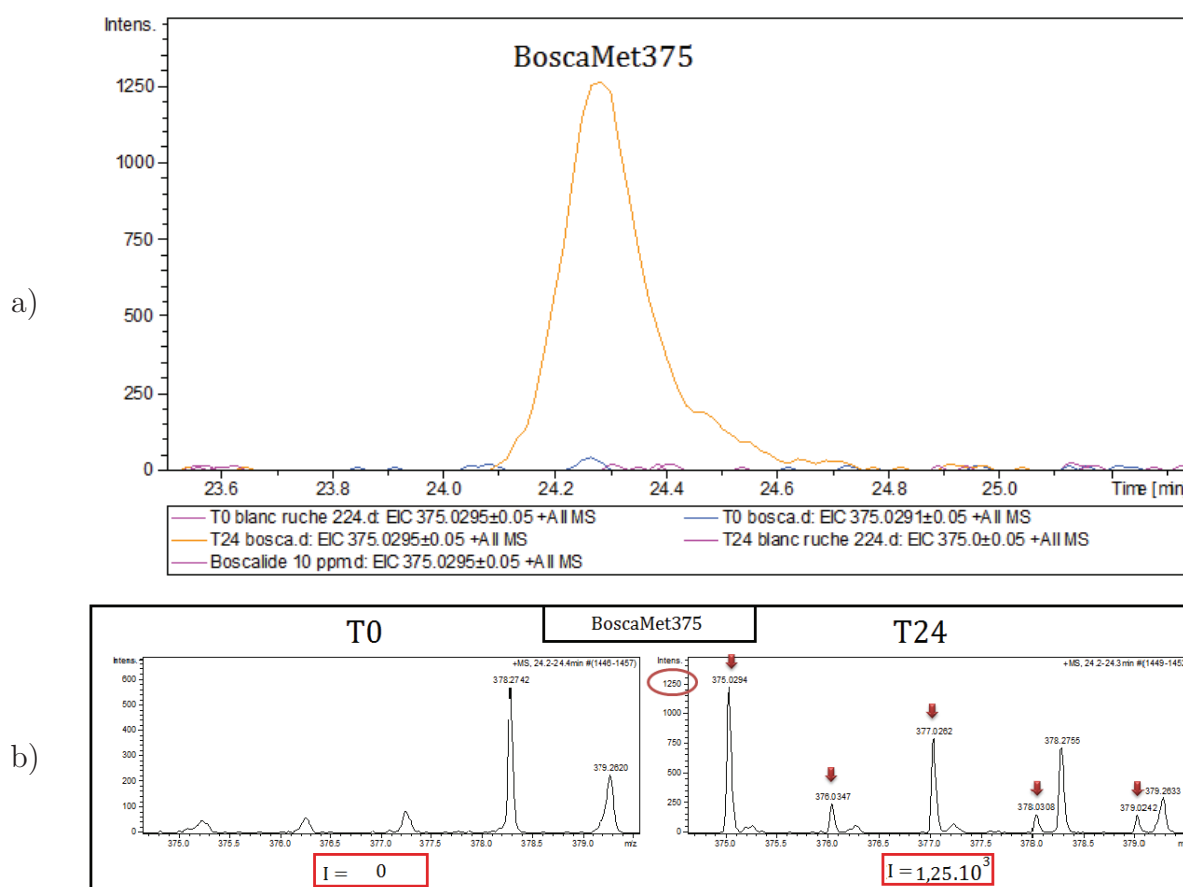


Figure III-28 a) Trace chromatographique de l'adduit $[M+H]^+$ du composé $C_{18}H_{12}Cl_2N_2O_3$, de l'ion à 375,03 Da dans les différents extraits, b) Comparaison des spectres de masse à T0 et T24 pour m/z 375,03 Da

La comparaison des spectres de masse des échantillons « T0 bosca » et « T24 bosca » montre que les ions correspondant au massif isotopique du métabolite recherché sont uniquement présents dans l'échantillon T24 avec une intensité d'environ 1250 coups.

L'erreur en masse est de 4,5 ppm et la correspondance du profil isotopique de 12 mSigma, permettant ainsi de confirmer que ce composé correspond à la formule brute du métabolite connu recherché ($C_{18}H_{12}Cl_2N_2O_3$).

Métabolites suspectés du thiaclopride

Deux m/z sont suspectés de correspondre à des métabolites du thiaclopride : le premier de masse m/z 237,05 Da, et le second de masse 269,02 Da, tous deux correspondant à un seul pic chromatographique.

m/z 237,05 Da

Le m/z recherché correspond à l'adduit $[M+H]^+$ de la molécule $C_{10}H_9ClN_4O$ dont la structure est présentée dans la Figure III-29, d'après (157).

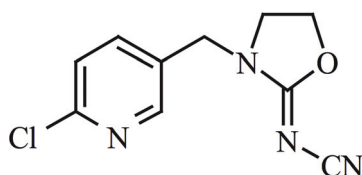


Figure III-29 Structure possible du métabolite du thiaclopride de m/z 237,05 Da, d'après (157)

Dans l'échantillon d'abeille soumis à la solution de pulvérisation (« T24 Thiaclo»), représentés par le tracé orange, un seul pic chromatographique, à 13,0 min, correspond à la formule brute du métabolite connu recherché de m/z 237,05 Da.

La comparaison des spectres de masse à T0 et T24 montre que les ions correspondant au massif isotopique du métabolite recherché sont uniquement présents dans l'échantillon T24 avec une intensité d'environ 4000 coups. L'erreur en masse de 1,6 ppm et le mSigma de 9,8, permettent ainsi de confirmer que la formule brute de ce composé correspond au métabolite connu recherché ($C_{10}H_9ClN_4O$).

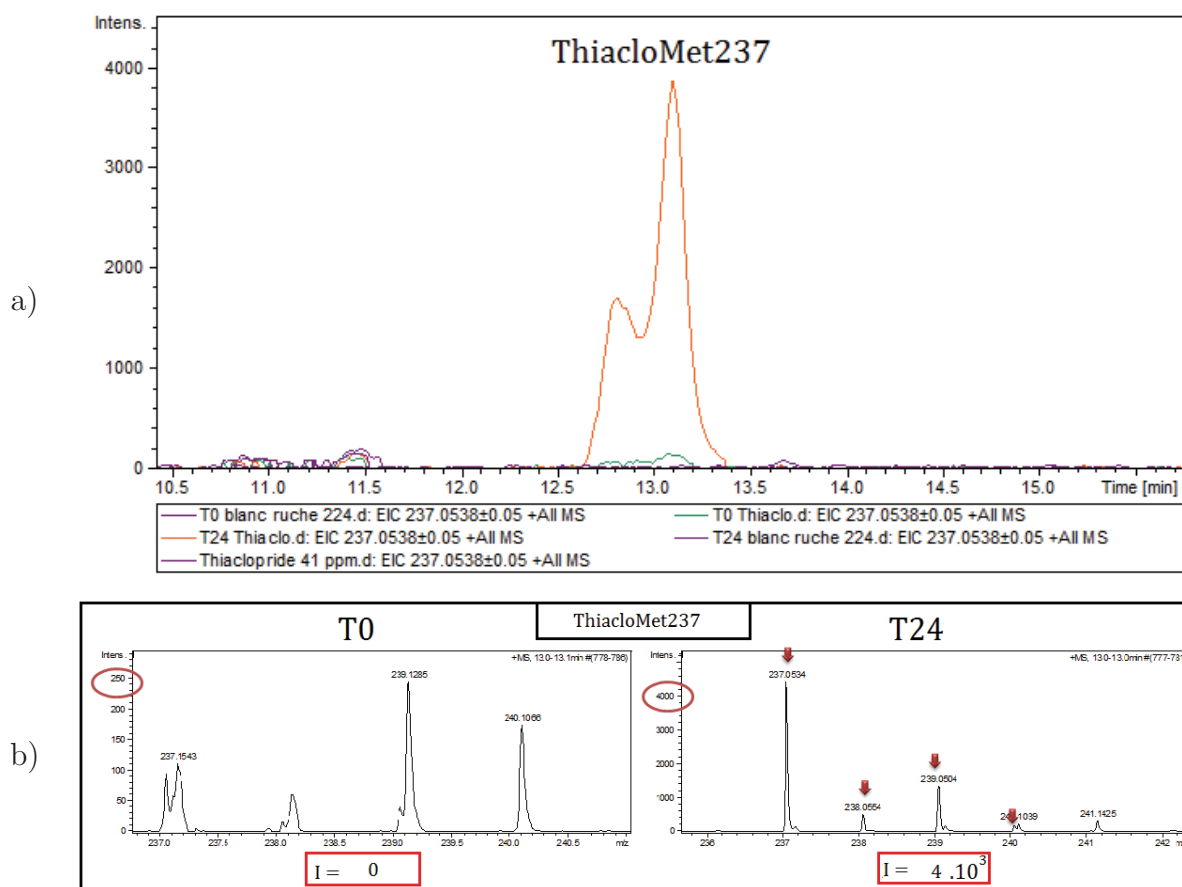


Figure III-30 a) Trace chromatographique de l'adduit $[M+H]^+$ du composé $C_{10}H_9ClN_4O$, m/z 237,05 Da, b) Comparaison des spectres de masse du m/z 237,05 Da à T0 et T24

m/z 269,02 Da

La masse 269,02 Da correspond à l'adduit $[M+H]^+$ de la molécule $C_{10}H_9ClN_4SO$ dont la structure est présentée dans la Figure III-31, d'après (157).

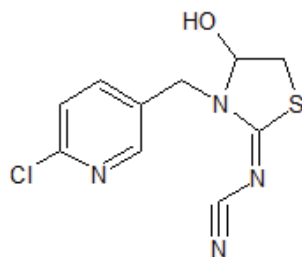


Figure III-31 Structure du métabolite du thiachlopride de m/z 269,02 Da, d'après (157)

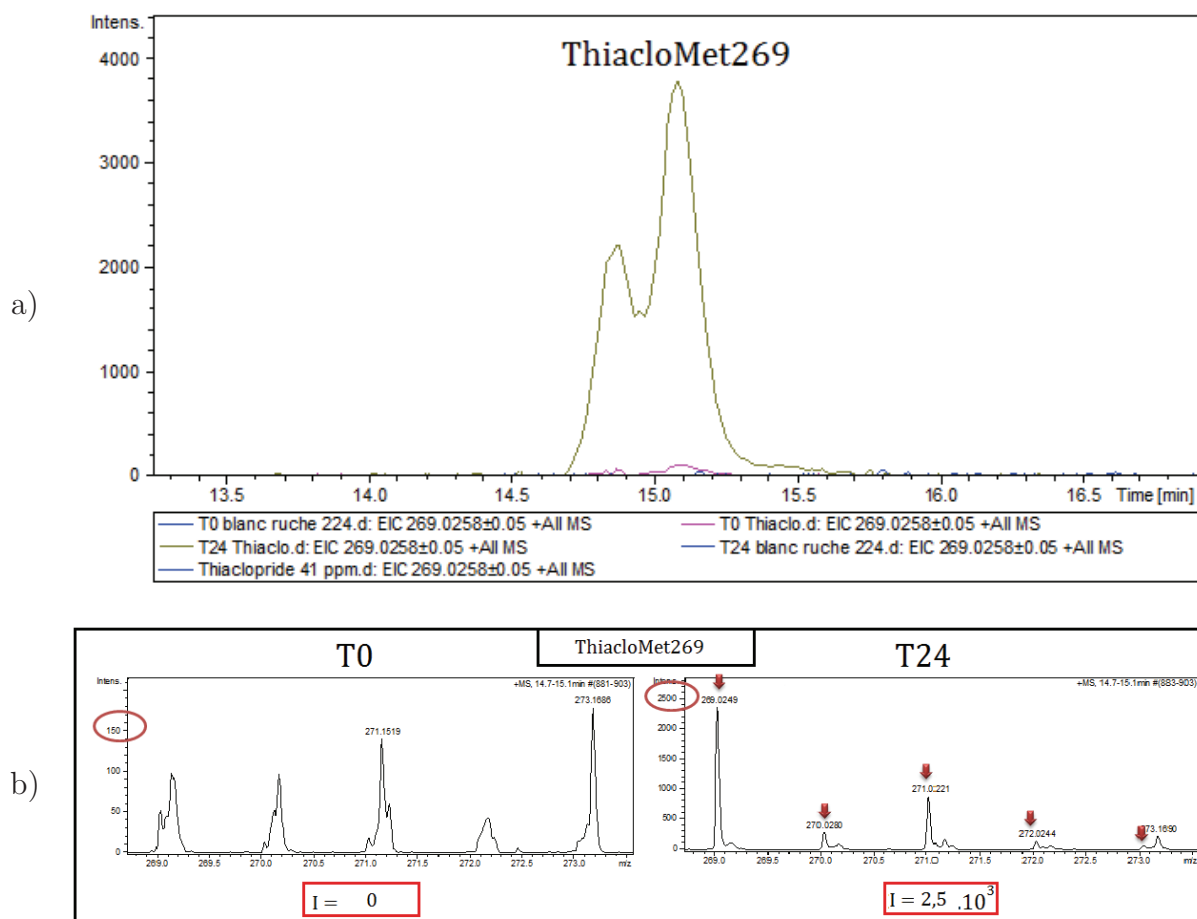


Figure III-32 a) Trace chromatographique de l'adduit $[M+H]^+$ du composé $C_{10}H_9ClN_4SO$, m/z 269,02 Da, b) Comparaison des spectres de masse du m/z 269,02 Da à T0 et T24

L'analyse de l'échantillon d'abeille soumis à la solution de pulvérisation (« T24 Thiacle»), représenté par le tracé kaki, montre un seul pic chromatographique à 15,0 min correspondant à la formule brute du métabolite connu recherché de m/z 269,02 Da.

La comparaison des spectres de masse des échantillons à T0 et T24 montre que les ions correspondant au massif isotopique du métabolite recherché sont uniquement présents dans l'échantillon T24 avec une intensité d'environ 2500 coups.

L'erreur en masse de 0,5 ppm et le m Sigma de 24,6 permettent ainsi de confirmer que la formule brute de ce composé correspond au métabolite recherché ($C_{10}H_9ClN_4SO$).

4.3.3. Recherche des métabolites chlorés, bromés et/ou soufrés, non répertoriés

L'application du protocole de recherche basée sur les profils isotopiques particuliers (4.1.7) a permis de détecter deux m/z pouvant correspondre à des métabolites, l'un du thiaméthoxame et l'autre de la deltaméthrine (Tableau III-13).

Tableau III-13 Rapport m/z et temps de rétention de métabolites potentiels obtenus à l'issue de la recherche de métabolites chlorés, bromés et/ou soufrés, non répertoriés

Molécule mère	Métabolite m/z (Da)	t_R (min)
Thiaméthoxame	253,03	17,5
Deltaméthrine	438,23	28,4

Métabolites suspectés du thiaméthoxame : m/z 253,03 Da

Après avoir localisé un massif isotopique caractéristique de la présence d'un atome de chlore à environ 17,5 min de m/z 253,03 Da, l'EIC a été tracé afin de vérifier qu'il s'agissait bien d'un pic chromatographique et, de la même manière que précédemment, qu'il n'était présent que dans l'extrait T24 (Figure III-33).

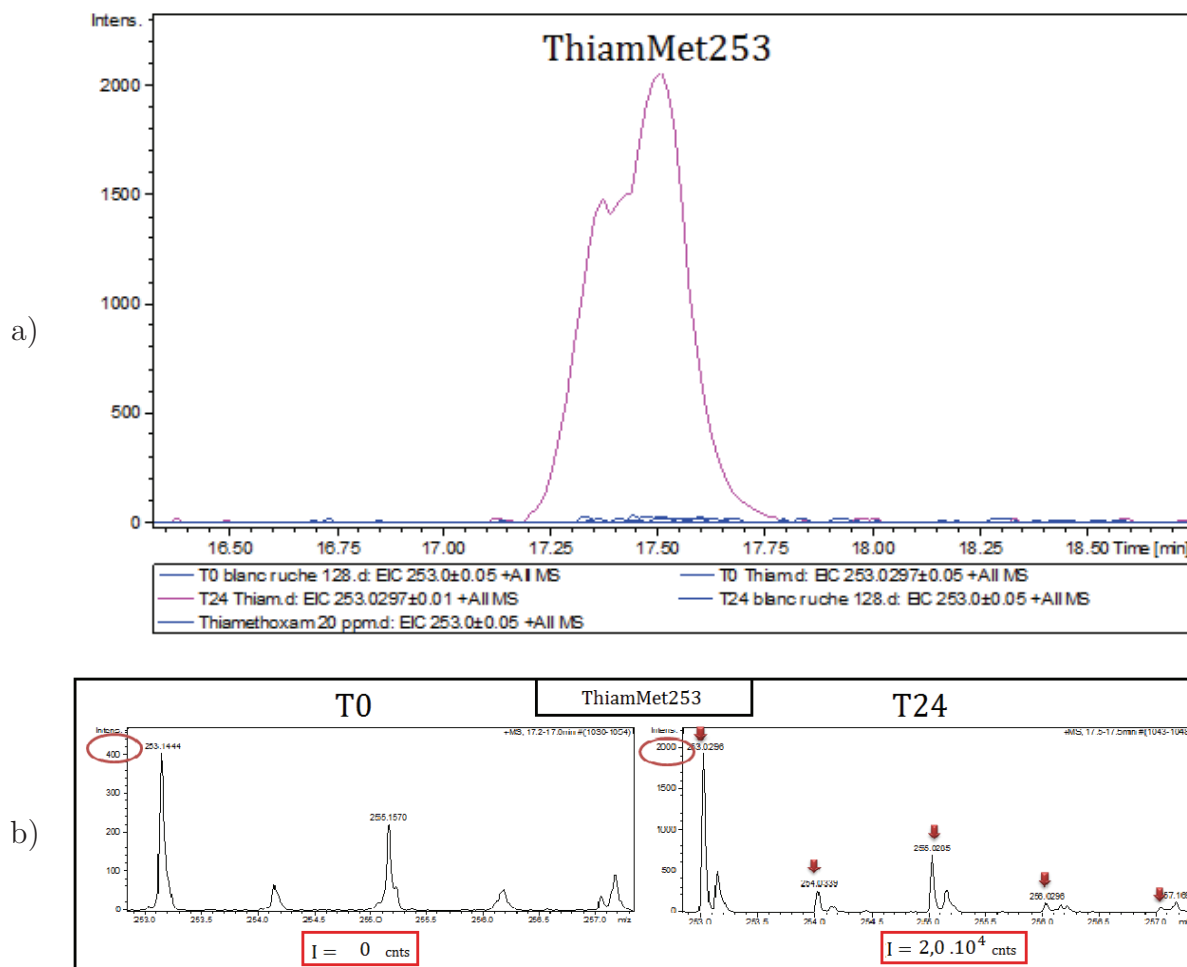


Figure III-33 a) Trace chromatographique de l'adduit $[M+H]^+$ du composé de m/z 253,03 Da, b) Comparaison des spectres de masse du m/z 253,03 Da à T0 et T24

L'analyse de l'échantillon d'abeille soumis à la solution de pulvérisation (« T24 Thiam»), représentés par le tracé rose, montre un seul pic chromatographique à 17,5 min correspondant au m/z 253,03 Da.

La comparaison des spectres de masse issus des échantillons « T0 thiam» et « T24 thiam» montre que les ions correspondant au massif isotopique du métabolite suspecté sont uniquement présents dans l'échantillon T24 avec une intensité d'environ 2000 coups.

Deux hypothèses de formules correspondent à ce spectre de masse :

- $C_{13}H_6ClN_4$: erreur en masse : -8,3 ppm et mSigma : 16,2
- $C_{12}H_{10}ClO_4$: erreur en masse : -13,6 ppm et mSigma : 11,6

À ce stade, il n'est pas possible de privilégier l'une ou l'autre des formules brutes. De plus, l'erreur sur la masse exacte monoisotopique de l'ion parent est supérieure à 5 ppm. D'autres analyses (fragmentation) sont nécessaires pour confirmer l'une ou l'autre de ces formules brutes.

Métabolites suspectés de la deltaméthrine : m/z 438,23 Da

La présence d'un atome de brome a été révélée à environ 28,4 min, pour un m/z 438,23 Da. L'EIC a été tracé afin de vérifier qu'il s'agissait bien d'un pic chromatographique et, de la même manière que précédemment, qu'il n'était présent que dans l'extrait T24 (Figure III-34).

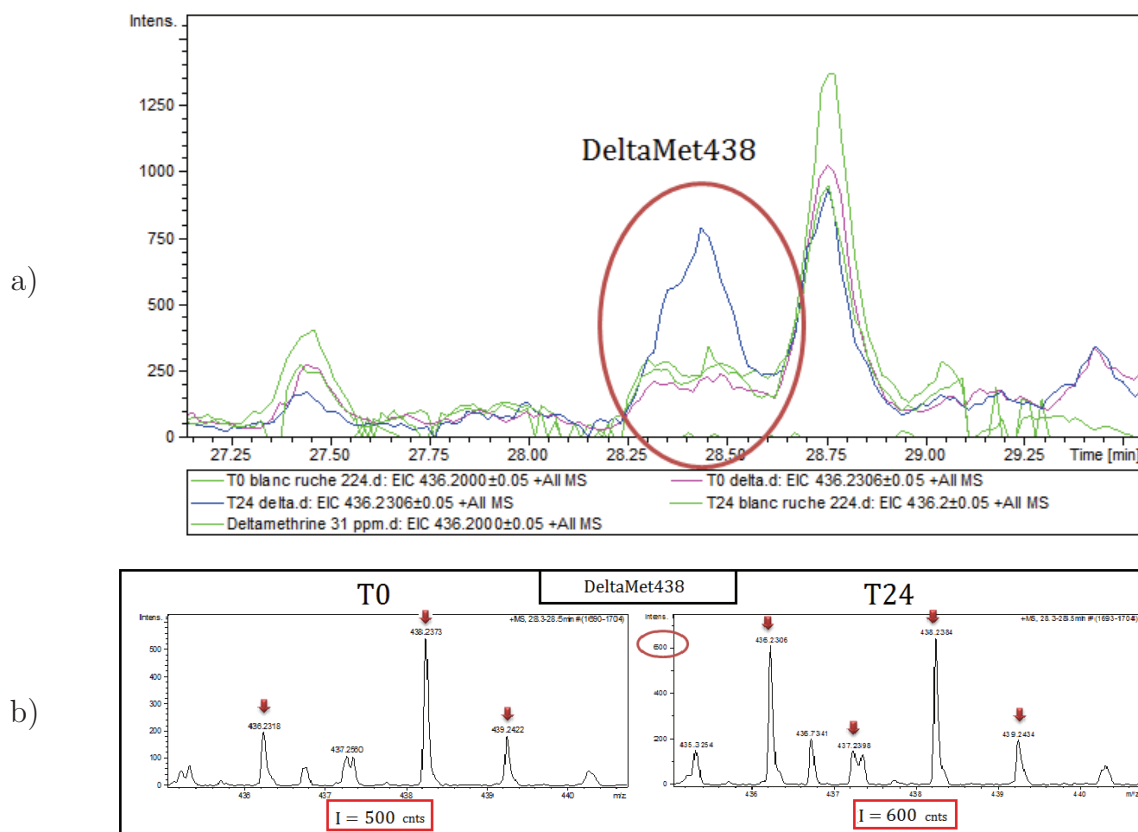


Figure III-34 a) Trace chromatographique de l'adduit $[M+H]^+$ du composé de m/z 438,23 Da, b) Comparaison des spectres de masse du m/z 438,23 Da à T0 et T24

L'analyse de l'échantillon d'abeille soumis à la solution de pulvérisation (« T24 Delta »), représentés par le tracé bleu, montre un seul pic chromatographique à 28,4 min correspondant au m/z 438,23 Da.

La comparaison des spectres de masse issus des échantillons T0 et T24 montre que les ions correspondant au massif isotopique du métabolite suspecté sont présents dans les deux extraits à des intensités de 500 coups (T0) et 600 coups (T24). Cependant, le massif isotopique caractéristique d'une molécule bromée n'est observée que dans le T24.

Trois hypothèses de formules brutes ont été générés :

- $C_{23}H_{39}BrN_3$: erreur en masse : -18,2 ppm et mSigma : 37,0
- $C_{21}H_{44}BrNOP$: erreur en masse : -14,5 ppm et mSigma : 43,3
- $C_{21}H_{43}BrNO_3$: erreur en masse : 4,4 ppm et mSigma : 42,9

Les tolérances sur les résultats ne sont pas comprises dans les limites fixées (5 ppm et 30 mSigma), certainement en raison de la très faible intensité des ions du massif isotopique (600 coups). Ces résultats ne permettent pas, à ce stade, d'attribuer une formule brute à la masse 438,23 Da.

4.3.4. Tableau récapitulatif des métabolites suspectés

À l'issue de ces recherches de métabolites connus et de métabolites non répertoriés, plusieurs métabolites ou ions suspects (m/z) ont été proposés. Le Tableau III-14 liste les différents métabolites ainsi que leurs possibles formules brutes, accompagnées des précisions sur le m/z (ppm) et le mSigma.

Dans le but d'obtenir des informations structurales supplémentaires et d'augmenter les niveaux de confiance pour l'identification de ces métabolites, des analyses de fragmentation par QqToF ont été menées.

Molécule mère	Protocole de recherche	m/z (Da)	tR (min)	Formule brute	Adduit	Précision (ppm)	mSigma	Intensité m/z (coups)
Boscalide	Métabolites connus	25,4	25,4			-4,7	19,7	25 000
		359,03	26,5	$C_{18}H_{13}Cl_2N_3O_2$	$[M+H]^+$	-3,6	76,5	1 000
			28,2			-4,5	16,4	9 500
Thiaclopride	Métabolites connus	375,03	29,6			1,1	44,0	1 000
			24,3	$C_{18}H_{13}Cl_2N_3O_3$	$[M+H]^+$	4,5	12,0	1 200
Thiaméthoxame	Métabolites connus	237,05	13,0	$C_{10}H_9ClN_4O$	$[M+H]^+$	1,6	9,8	4 000
		269,02	15,0	$C_{10}H_9N_4ClSO$	$[M+H]^+$	0,5	24,6	2 500
Deltaméthrine	Métabolites non répertoriés	253,03	17,5	$C_{13}H_6ClN_4$	ND	-8,3	16,2	2 000
				$C_{12}H_{10}ClO_4$	ND	-13,6	11,6	
Deltaméthrine	Métabolites non répertoriés	438,23	28,4	$C_{23}H_{39}BrN_3$	ND	-18,2	37,0	
				$C_{21}H_{44}BrNOP$	ND	-14,2	43,3	600
				$C_{21}H_{43}BrNO_3$	ND	4,4	42,9	

ND : Non Déterminé

Tableau III-14 Liste des métabolites suspectés à l'issue des recherches des métabolites connus et des métabolites non répertoriés

4.3.5. Analyses de fragmentation et identification des métabolites

L'élucidation de la structure des métabolites peut s'appuyer sur la présence de fragments communs entre les métabolites et les composés parents. Pour cela, des analyses de fragmentation (MS/MS) des composés parents et des métabolites potentiels identifiés dans la partie précédente ont été réalisées, sur le même appareil (QqToF) et dans les mêmes conditions.

Dans les chapitres qui suivent, les tableaux permettent d'une part de répertorier les fragments obtenus pour la molécule mère ainsi que ceux obtenus pour les métabolites, et d'autre part de les comparer afin de conclure sur le degré d'identification des métabolites.

Métabolites du boscalide

Le Tableau III-15 est un récapitulatif des résultats obtenus lors des analyses de fragmentation du boscalide et de ses métabolites BoscaMet359Px et BoscaMet375.

L'analyse MS/MS du boscalide a généré plusieurs ions fragments, annotés à partir des données issues de la base de données MassBank (151). L'ion fragment m/z 307,06 Da est obtenu suite à la perte d'un atome de chlore alors que l'ion fragment m/z 272,09 Da est issu de la perte de deux atomes de chlore. L'ion fragment m/z 289,05 Da est formé par la perte d'une molécule d'eau et d'un atome de chlore. Enfin, l'ion m/z 139,99 Da peut être attribué au fragment $C_6H_3ClNO^+$ du boscalide, et l'ion 112,04 Da au fragment $C_2H_9ClN_2O^+$.

Tableau III-15 Récapitulatif des analyses de fragmentation des métabolites BoscaMet359Px (P1 à P4) et BoscaMet375

Nom	Fragments m/z expérimental (Da)	Formule brute		Erreur en masse (ppm)
		(d'après ^a MassBank ^b SmartFormula)	m/z théorique (Da)	
Boscalide	112,0398	$C_2H_9ClN_2O^+$ ^a	112,0397	0,9
	139,9899	$C_6H_3ClNO^+$ ^a	139,9897	1,4
	272,0942	$C_{18}H_{12}N_2O^+$ ^a	272,0944	-0,7
	289,0514	$C_{18}H_{10}ClN_2^+$ ^a	289,0527	-4,5
	307,0625	$C_{18}H_{12}ClN_2O^+$ ^a	307,0632	-2,3
BoscaMet359P1	139,9898	$C_6H_3ClNO^+$ ^a	139,9897	-0,7
	323,0572	$C_{18}H_{12}ClN_2O^+ + O$ ^{ab}	323,0576	-1,2
BoscaMet359P2	139,9899	$C_6H_3ClNO^+$ ^a	139,9897	1,4
	323,0573	$C_{18}H_{12}ClN_2O^+ + O$ ^{ab}	323,0576	-0,9
BoscaMet359P3	139,9896	$C_6H_3ClNO^+$ ^a	139,9897	-0,7
	323,0561	$C_{18}H_{12}ClN_2O^+ + O$ ^{ab}	323,0576	-4,6
BoscaMet359P4	155,9842	$C_6H_3ClNO^+ + O$ ^{ab}	155,9840	1,3
	113,0038	$C_5H_4ClN^+$	113,0033	4,4
BoscaMet375	139,9903	$C_6H_3ClNO^+$ ^a	139,9897	4,3
	321,0436	$C_{18}H_{10}ClN_2O_2^+$	321,0425	3,4

Le Tableau III-16 identifie par une croix les fragments communs aux métabolites et au boscalide.

Tableau III-16 Comparaison des fragments générés par les différents métabolites avec ceux générés par le boscalide

Fragments		BoscaMet359					Bosca
Formule	m/z (Da)	Boscalide	P1	P2	P3	P4	Met375
$C_2H_9ClN_2O^+$	112,0397	X	X		X		X
$C_6H_3ClNO^+$	139,9898	X	X	X	X		X
$C_6H_3ClNO^+ + O$	155,9847					X	
$C_{18}H_{12}N_2O^+$	272,0944	X					
$C_{18}H_{11}N_2O^+ + O$	287,0815		X	X	X		
$C_{18}H_{10}ClN_2^+$	289,0527	X					
/	293,0474						X
$C_{18}H_{12}ClN_2O^+$	307,0633	X					
/	321,0436						X
$C_{18}H_{12}ClN_2O^+ + O$	323,0582		X	X	X		

Les métabolites forment des fragments communs avec le boscalide. C'est le cas du m/z 139,98 Da qui est également formé lors de la fragmentation des métabolites BoscaMet P1, P2, P3 et BoscaMet375. Cette constatation confirme l'hypothèse de parenté entre ces quatre métabolites et le boscalide.

Les métabolites BoscaMet359 P1, P2 et P3 possèdent un fragment supplémentaire commun entre eux : m/z 323,05 Da pouvant être attribué à l'ion $C_{18}H_{12}ClN_2O^+$ (m/z 307,06 Da) avec ajout d'un atome d'oxygène. La fragmentation de ces trois composés hydroxylés présente également l'ion m/z 139,99 Da, caractéristique du cycle pyridine non modifié. Ceci suppose que l'hydroxylation a eu lieu sur l'un des deux cycles benzéniques (Figure III-35). Cependant, les analyses réalisées ne permettent pas de conclure sur la structure exacte de ces molécules.

Les métabolites BoscaMet359P1, P2 et P3 possèdent les mêmes profils de fragmentation puisqu'ils génèrent deux fragments identiques. Ces trois métabolites, qui possèdent le même m/z, les mêmes fragments mais des temps de rétention différents seraient donc des isomères de position, du groupement -OH.

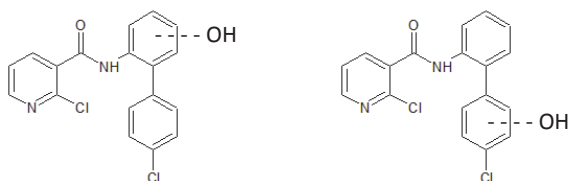


Figure III-35 Structures possibles des métabolites BoscaMet359P1, P2 et P3

Le métabolite BoscaMet359P4 présente deux fragments, dont le m/z 155,98 Da qui pourrait correspondre au fragment m/z 139,03 Da, auquel serait ajouté un atome d'oxygène. Donc il s'agirait d'un fragment commun avec la molécule mère et les autres métabolites, auquel se serait ajouté un groupement $-OH$. La présence de l'ion fragment m/z 155,98 Da combinée à l'absence du m/z 139,03 Da permet de conclure que le groupement $-OH$ est ajouté sur le cycle pyridine (Figure III-36). Cependant, les résultats obtenus ne permettent pas de conclure sur la position exacte de ce groupement au sein de ce cycle.

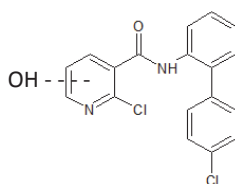


Figure III-36 Structures possibles du métabolite BoscaMet359P4

Le métabolite BoscaMet375 se serait formé par ajout de deux groupements $-OH$ sur le boscalide. La présence de l'ion fragment m/z 139,03 Da combinée à l'absence du m/z 155,98 Da permet de conclure que les groupements $-OH$ se sont ajoutés aux cycles benzéniques. Cependant, les analyses réalisées ne permettent pas de conclure sur la position exacte de ces groupements hydroxyles (Figure III-37).

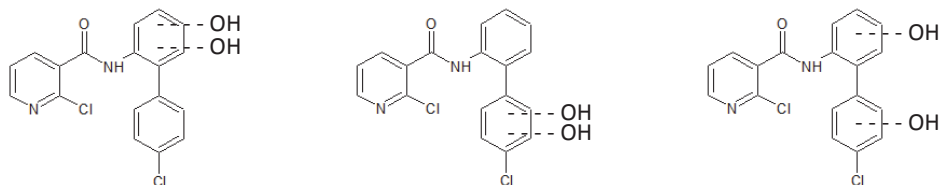


Figure III-37 Structures possibles du métabolite BoscaMet375

A ce stade, afin de confirmer leur identité, le seul moyen est de comparer les données précédentes à celles que l'on pourrait obtenir à partir de standards analytiques.

Synthèse d'étalons et confirmation

Le composé synthétisé DIV1 (Figure III-13) a été analysé dans les conditions des analyses effectuées pour la recherche des métabolites. Le temps de rétention, le m/z, et les ions fragments ont été comparés.

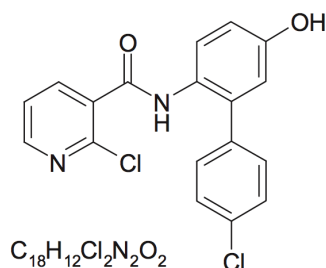


Figure III-38 Composé synthétisé DIV1, pouvant correspondre aux métabolites BoscaMet359 P1, P2 ou P3

La comparaison des données obtenues pour les métabolites suspectés, BoscaMetP1, P2 et P3 avec celles du métabolite synthétisé DIV1, a permis de conclure que ce dernier correspond au métabolite BoscaMetP2. En effet, ces deux composés présentent des temps de rétention similaires ($26,5 \text{ min} \pm 20\%$), un m/z similaire (359,03 Da) et produisent deux ions fragments identiques (m/z 139,99 Da et m/z 323,05 Da).

De la même manière, la comparaison des données chromatographiques) et spectrales des potentiels marqueurs d'exposition (309,07 Da et 325,07 Da) avec les étalons synthétisés (DIV2, DIV3, DIV4 et DIV5) nous permettent d'affirmer que les m/z 309,07 Da et m/z 325,07 Da présents dans la solution de pulvérisation correspondent respectivement aux composés synthétisés DIV3 et DIV4, avec un niveau de confiance de 1 (146). En effet les temps de rétention, les m/z de l'ion parent et fragments correspondent.

Bilan de l'identification des métabolites du boscalide et de ses marqueurs d'exposition

Le métabolite BoscaMetP2 a été identifié avec une confiance de niveau 1 à partir de l'étalon analytique : DIV1. Deux marqueurs d'exposition ont été identifiés avec une confiance de niveau 1 : les composé DIV3 et DIV4. Les métabolites, BoscaMetP1, P3, P4 et BoscaMet375, ont été identifiés avec une confiance de niveau 3. En effet la

formule brute est confirmée par les analyses MS et MS/MS mais, à ce stade il n'est pas possible de dire exactement où sont fixés les groupements –OH.

Le Tableau III-17 reprend l'ensemble des résultats de l'identification des métabolites et marqueurs d'exposition au boscalide.

Aucun des métabolites ci-dessus n'a, à notre connaissance, été identifié auparavant dans les abeilles ou les produits de la ruche. En revanche, certains d'entre eux ont été identifiés dans des voies métaboliques d'animaux et de végétaux, dans des voies de dégradation dans le sol, ou encore dans des voies de dégradation photochimiques et des simulations de métabolisation électrochimiques.

Ainsi, le métabolite hydroxylé du boscalide, DIV1, est l'un des principaux métabolites retrouvé dans des chèvres et les poules après une administration orale au boscalide (marqué au ^{14}C). Chez les poules, le boscalide est largement métabolisé et excrété, puisqu'environ 95% du carbone marqué est retrouvé dans les fèces et l'urine. Le reste des métabolites étant retrouvé dans le lait et les oeufs, les muscles, la graisse, le foie et les reins. (154)

Le métabolite hydroxylé BoscaMet359P4 est, quant à lui, retrouvé dans les voies métaboliques animales (chèvre), végétales (haricot) et les voies de dégradation dans le sol. (154)

Le métabolite BoscaMet375 intervient dans le métabolisme des chèvres, des poules et des haricots (154). Il a également été reporté comme produit de photodégradation du boscalide (155).

Tableau III-17 Récapitulatif des métabolites et des marqueurs d'exposition du bosca-
lide identifiés chez l'abeille et dans la solution de pulvérisation au cours des expé-
riences *in vivo*

Nom		Niveau de confiance (146)	m/z (Da)	Formule brute	Structure
Métabolites	DIV1	1			
	Bosca Met 359		359,03	$C_{18}H_{12}Cl_2N_2O_2$	
		3			
	Bosca Met375		375,03	$C_{18}H_{12}Cl_2N_2O_3$	
Marqueurs d'exposition Identifiés	DIV3	1	309,08	$C_{18}H_{13}ClN_2O$	
	DIV4	1	325,07	$C_{18}H_{13}ClN_2O_2$	

Une étude sur la simulation électrochimique de la métabolisation de pesticides (153) montre la génération d'un composé correspondant au boscalide hydroxylé, suite à l'ajout d'un groupement $-OH$ sur le cycle benzénique supérieur. Ce composé pourrait correspondre aux métabolites DIV1, BoscaMet359P1 ou encore BoscaMet359P3, obtenus chez l'abeille.

En ce qui concerne le marqueur d'exposition identifié DIV3, il fait partie de la liste des métabolites issus du métabolisme animal, végétal et des produits de dégradation du boscalide observés dans le sol. En ce qui concerne DIV4, il est répertorié en tant que métabolite du boscalide chez les chèvres, poules et comme produit de dégradation dans le sol. (154)

Les composés DIV2 et DIV5 sont également répertoriés comme produit de dégradation du boscalide dans le sol (154), et produit de dégradation électrochimique (153), respectivement.

Les métabolites retrouvés chez l'abeille sont issus de réactions d'hydroxylation, par ajout d'un ou de deux groupements $-OH$ sur les cycles pyridinique ou benzéniques, et/ou perte d'un atome de chlore. Ceci laisse supposer que le boscalide est majoritairement métabolisé par des réactions de phase I (fonctionnalisation). Cependant, les données obtenues ne sont pas suffisantes pour une interprétation plus poussée.

Finalement, très peu de données sont disponibles sur les voies de métabolisation du boscalide et, à notre connaissance, il n'existe aucune étude sur la toxicité des métabolites reportés.

Métabolites du thiaclopride

Le Tableau III-18 récapitule les résultats obtenus lors de la fragmentation du thiaclopride et de ses métabolites de m/z 237,05 Da (Métabolite 237) et 269,02 Da (Métabolite 269).

Tableau III-18 Récapitulatif des analyses de fragmentation du thiaclopride et de ces potentiels métabolites de m/z 237,05 Da et 269,02 Da

Composé	Fragments m/z expérimental (Da)	Formule brute		Erreur en masse (ppm)
		(d'après ^a MassBank ^b SmartFormula)	m/z théorique (Da)	
Thiaclopride	90,0337	C ₆ H ₄ N ⁺ ^a	90,0338	0,9
	99,0004	C ₅ H ₄ Cl ⁺ ^a	98,9996	-7,8
	126,0110	C ₆ H ₅ ClN ⁺ ^a	126,0105	-4,2
	186,0131	C ₈ H ₉ ClNS ⁺ ^a	186,0139	4,4
Métabolite 237	90,0332	C ₆ H ₄ N ⁺ ^a	90,0338	6,6
	98,9995	C ₅ H ₄ Cl ⁺ ^a	98,9996	1,1
	102,1294	/	/	/
	126,0106	C ₆ H ₅ ClN ⁺ ^a	126,0105	-0,4
Métabolite 269	90,0333	C ₆ H ₄ N ⁺ ^a	90,0338	5,6
	126,0109	C ₆ H ₅ ClN ⁺ ^a	126,0105	-3,5
	157,9824	/	/	/
	175,1169	/	/	/
	202,0278	/	/	/
	241,0331	/	/	/

Le Tableau III-19 permet, quant à lui, d'identifier les fragments communs aux métabolites potentiels et au thiaclopride. Les croix indiquent la présence d'un fragment dans le spectre de fragmentation du composé concerné.

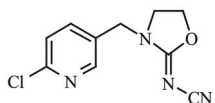
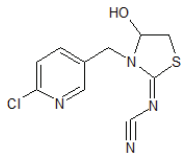
Tableau III-19 Comparaison des fragments générés par les deux métabolites (m/z 237,05 Da et 269,02 Da) avec ceux générés par le thiaclopride

Fragments		Thiaclopride	Métabolite 237	Métabolite 269
Formule	m/z (Da)			
C ₆ H ₄ N ⁺	90,0337	X	X	X
C ₅ H ₄ Cl ⁺	99,0004	X	X	
/	102,1294		X	
C ₆ H ₅ ClN ⁺	126,0106	X	X	X
/	157,9824			X
/	175,1169			X
C ₈ H ₉ CINS ⁺	186,0131	X		
/	202,0278			X
/	241,0331			X

Le métabolite 237, de m/z 237,05 Da, et le métabolite 269, de m/z 269,02 Da, possèdent respectivement trois et deux fragments communs à ceux générés lors de la fragmentation du thiaclopride, dont deux sont chlorés. Ainsi, la parenté de ces composés avec le thiaclopride est démontrée et ces métabolites sont donc identifiés avec un niveau de confiance de 2 (146).

Le Tableau III-20 reprend l'ensemble des résultats de l'identification des deux métabolites du thiaclopride.

Tableau III-20 Récapitulatif des métabolites m/z 237,05 Da et 269,02 Da du thiaclopride identifiés chez l'abeille au cours des expériences *in vivo*

Nom	t _R (min)	Formule brute	m/z (Da)	Structure
Métabolite 237	13,0	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ O	237,0537	
Métabolite 269	15,0	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ SO	269,0258	

Aucun des métabolites ci-dessus n'a, à notre connaissance, été détecté auparavant dans les abeilles ou les produits de la ruche. En revanche, ils sont répertoriés en tant que métabolites du thiaclopride chez d'autres espèces. Ainsi, le métabolite 237 fait partie de la voie de métabolisation du thiaclopride chez les chèvres, les poules et les rats. Il est retrouvé notamment dans le lait, la graisse, le foie et les reins chez la chèvre, et dans le foie chez la poule. De la même manière, le métabolite 269 est retrouvé dans les voies de métabolisation du thiaclopride chez les plantes (pomme, tomate et coton) et les animaux (chèvre, poule et rat). Il se retrouve plus particulièrement dans le lait, la graisse, les muscles, le foie et les reins chez la chèvre, et les œufs, le foie et les muscles chez la poule. (157)

Finalement, de la même manière que pour les métabolites du boscalide, le manque de données disponibles ne nous permet pas de conclure sur la voie de métabolisation du thiaclopride chez les abeilles, ni sur la toxicité de ces composés.

Métabolite du thiaméthoxame

Le Tableau III-21 est un récapitulatif des résultats obtenus lors des analyses de fragmentation du thiaméthoxame et de son métabolite 253.

Tableau III-21 Fragments issus de l'analyse QqToF du thiaméthoxame et de son potentiel métabolite 253

Composé	Fragments m/z expérimentaux (Da)	Formule brute (d'après ^a MassBank ^b SmartFormula)	m/z théorique (Da)	Erreur en masse (ppm)
Thiaméthoxame	122,0716	C ₆ H ₈ N ₃ ⁺ ^a	122,0713	-2,9
	131,9672	C ₄ H ₃ ClNS ⁺ ^a	131,9669	-1,9
	152,0278	C ₆ H ₆ N ₃ S ⁺ ^a	152,0277	-0,8
	181,0537	C ₇ H ₉ N ₄ S ⁺ ^a	181,0542	3,2
	199,0643	C ₇ H ₁₁ N ₄ OS ⁺ ^a	199,0648	2,4
	211,0642	C ₈ H ₁₁ N ₄ OS ⁺ ^a	211,0648	3,1
	246,0326	C ₈ H ₁₁ ClN ₄ OS ⁺ ^a	246,0337	4,5
Métabolite 253	126,0104	C ₆ H ₅ ClN ⁺ ^b	126,0105	0,7
	186,0201	/	/	/

ng : non généré par Smart Formula

Le métabolite 253, de m/z 253,03 Da, ne présente aucun fragment commun au thiaméthoxame. À partir des données obtenues par MS et MS/MS du thiaclopride et de son potentiel métabolite 253, il n'est pas possible de proposer une formule brute et donc une structure. Il s'agit donc pour ce composé d'une identification de niveau 5, c'est à dire que cette molécule n'est identifiée que par sa masse exacte, à savoir son rapport m/z 253,03 Da (146).

Au cours des analyses de vérification de la présence des métabolites connus dans la solution de pulvérisation, un ion de m/z 248,02 Da au t_R 14,5 min, a été détecté. Cet ion correspondrait au métabolite du thiaméthoxame de formule brute C₈H₁₀ClN₃O₂S (erreur : 3,5 ppm et mSigma : 8), dont la structure est présentée dans la Figure III-39.

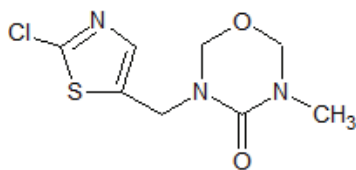


Figure III-39 Structure du métabolite 248 (m/z 248,02 Da, $C_8H_{10}ClN_3O_2S$) du thiaméthoxame détecté dans la solution de pulvérisation

De la même manière que pour le boscalide, cet ion, présent dans la solution de pulvérisation, pourra être considéré comme un marqueur d'exposition au thiaméthoxame. Ce composé n'ayant pas été synthétisé, une comparaison des données obtenues avec celle d'un étalon n'est pas possible et l'identification de ce composé reste de niveau 2 (146).

Ce composé (m/z 248,02 Da) est répertorié comme étant un métabolite du thiaméthoxame chez les animaux tels que les rats, les chèvres (présence dans le foie et les reins), les poules (présence dans les muscles, la graisse et les œufs), et les végétaux tels que le maïs, le riz, les poires et la laitue. Il est également l'un des produits de dégradation du thiaméthoxame par photolyse (156).

Métabolites de la deltaméthrine

Le Tableau III-22 est un récapitulatif des résultats obtenus lors des analyses de fragmentation de la deltaméthrine et de son métabolite 438.

Tableau III-22 Fragments issus de l'analyse QqToF de la deltaméthrine et de son potentiel métabolite 438

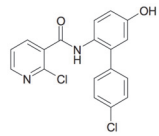
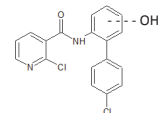
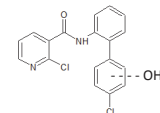
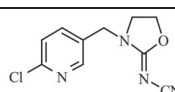
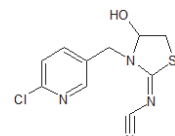
Composé	Fragments m/z expérimentaux (Da)	Formule brute (d'après (164))	m/z théorique (Da)	Erreur en masse (ppm)
Deltaméthrine	171,9822	C ₇ H ₉ Br ⁺	171,9882	34,9
	181,0602	/	/	/
	199,9751	/	/	/
	250,8993	C ₇ H ₉ Br ₂ ⁺	250,9066	28,9
	278,8955	C ₈ H ₉ Br ₂ O ⁺	278,9015	21,4
Métabolite 438	178,0880	/	/	/
	249,1576	/	/	/
	290,1917	/	/	/
	308,1976	/	/	/

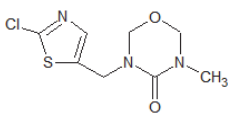
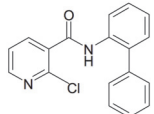
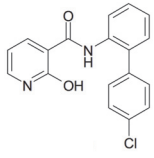
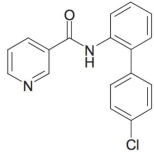
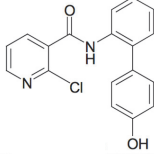
ng : non généré par Smart Formula

Le métabolite 438 (m/z 438,24 Da) ne présente aucun fragment commun à la deltaméthrine. À partir des données obtenues par MS et MS/MS de la deltaméthrine et de ce potentiel métabolite, il n'est pas possible de proposer une formule brute et donc une structure. Il s'agit donc pour ce composé d'une identification de niveau 5, c'est à dire que cette molécule n'est identifiée que par sa masse exacte, à savoir son rapport m/z 438,24 Da (146).

4.4. Bilan de l'identification des métabolites de pesticides dans les abeilles (tableau)

Tableau III-23 Tableau bilan : identité des métabolites de pesticides chez les abeilles

	Nom	t _R (min)	Niveau de confiance (146)	m/z (Da)	Formule brute	Structure	
Métabolites du boscalide	DIV1	26,5	1	359,03	C ₁₈ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O ₂		
	BoscaMet359	P1	25,4				
		P3	28,2				
		P4	29,6				
	BoscaMet375	24,3	3			375,03	C ₁₈ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O ₃
Métabolite du thiaclopride	237	13,0	2	237,05	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ O		
	269	15,0		269,02	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ SO		
Métabolite du thiaméthoxame	253	17,5	5	253,03	/	/	

Métabolite de la deltaméthrine	438	28,4	5	438,24	/	/	
Marqueur d'exposition au thiaméthoxame	Potentiel	248	14,5	2	248,02	$C_8H_{10}ClN_3O_2S$	
Marqueurs d'exposition au boscalide	Identifiés	DIV3	28,6	1	309,08	$C_{18}H_{13}ClN_2O$	
		DIV4	32,4	1	325,07	$C_{18}H_{13}ClN_2O_2$	
	Potentiels	DIV2	29,8	/	309,08	$C_{18}H_{13}ClN_2O$	
		DIV5	23,9	/	325,07	$C_{18}H_{13}ClN_2O_2$	

4.5. Détection et quantification du boscalide et de ses métabolites dans des échantillons d'abeilles

Le boscalide, son métabolite DIV1, ses marqueurs d'exposition DIV3 et DIV4 ainsi que ses marqueurs d'exposition potentiels DIV2 et DIV5, ont été recherchés dans 37 échantillons d'abeilles collectés dans des ruchers présentant des troubles. Seuls les résultats des échantillons dans lesquels ont été détecté(s) un ou plusieurs des composés cités ci-dessus sont présentés (Tableau III-24).

Tableau III-24 Concentrations en boscalide, en métabolite DIV1 et en marqueurs d'exposition DIV2, DIV3, DIV4 et DIV5 dans des échantillons d'abeilles provenant de ruchers symptomatiques

Échantillons	Boscalide	DIV1	DIV2	DIV3	DIV4	DIV5
	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ
	0,1 ng.g ⁻¹	0,1 ng.g ⁻¹	0,1 ng.g ⁻¹	0,1 ng.g ⁻¹	0,1 ng.g ⁻¹	0,1 ng.g ⁻¹
1	< LOQ	1.4	ND	ND	ND	ND
2	< LOQ	ND	ND	ND	ND	ND
3	37.5	6.3	ND	ND	ND	ND
4	<LOQ	1.4	ND	ND	ND	ND
5	47.6	36.3	ND	ND	ND	ND
6	< LOQ	2.1	ND	ND	ND	ND
7	< LOQ	1.4	ND	ND	ND	ND
8	< LOQ	1.4	ND	ND	ND	ND
9	< LOQ	ND	ND	ND	ND	ND
10	0.8	ND	ND	ND	ND	ND
11	ND	ND	ND	ND	ND	0.3
12	331.7	27.5	0.2	ND	ND	ND

ND : non détecté

Lors des analyses, 3 cas de figure se sont présentés :

- présence uniquement du boscalide
- présence simultanée du boscalide et de métabolite(s)
- présence uniquement de métabolite(s) ou marqueurs d'exposition

Parmi les échantillons contenant le boscalide, huit contiennent également le métabolite hydroxylé (DIV1), à des concentrations comprises entre 1,4 et 36,3 ng.g⁻¹. L'échantillon qui présente la concentration en boscalide la plus élevée (331,7 ng.g⁻¹) contient également DIV2, caractérisé par la perte d'un atome de chlore, à une très faible concentration (0,2 ng.g⁻¹).

Plusieurs échantillons, dans lesquels a été détecté et quantifié le métabolite hydroxylé (DIV1), ne contiennent pas le boscalide (<LOQ). De la même manière, le composé DIV5, qui résulte de la substitution d'un atome de chlore par un groupement hydroxyle (-OH), est détecté dans un échantillon dans lequel le boscalide n'est pas détecté. En l'absence de la molécule mère de boscalide, la présence de métabolites montre ainsi une exposition des abeilles au boscalide.

Dans l'état actuel de nos connaissances, c'est la première fois que des métabolites du boscalide sont identifiés et quantifiés dans des échantillons d'abeilles. Les résultats montrent également que les concentrations des métabolites/marqueurs d'exposition sont non négligeables comparées à celles du composé parent et que, par conséquent, ils contribuent à l'exposition générale des abeilles.

Les résultats issus de la recherche, de l'identification et de la quantification des métabolites et marqueurs d'exposition du boscalide ont fait l'objet d'une publication (79).

4.6. Conclusions et perspectives

Une méthodologie innovante et efficace a été développée pour étudier le métabolisme des pesticides chez l'abeille. En effet, elle propose la génération des métabolites *in vitro* et *in vivo* puis leurs détection et identification par spectrométrie à temps de vol, et enfin leur analyse par spectrométrie de masse triple-quadripôle dans des échantillons d'abeilles.

En ce qui concerne le boscalide, plusieurs métabolites hydroxylés ont été identifiés. L'hydroxylation a lieu à la fois sur les cycles benzénique et pyridinique. Les voies de métabolisation comprennent également des réactions de dés-halogénéation avec la perte d'un atome de chlore et/ou la substitution de cet atome par un groupement hydroxyle (-OH). Parmi les composés synthétisés trois (DIV1, DIV2 et DIV5) ont été détectés et quantifiés dans les échantillons d'abeille provenant de ruchers français, à des concentrations comparables ou parfois supérieures à celles de la molécule mère.

Certains d'entre eux ont été quantifiés en l'absence de la molécule mère. Ces résultats confirment l'intérêt de considérer non seulement les pesticides parents mais également leurs métabolites et marqueurs d'exposition, pour avoir une estimation plus juste de l'exposition globale des abeilles aux pesticides.

Suite à ces résultats, des tests de toxicité doivent maintenant être menés sur les métabolites identifiés afin d'étudier l'incidence de ces derniers sur les abeilles.

Finalement, les résultats des recherches de métabolites ont révélé que les abeilles sont soumises, non pas à des pesticides seuls, mais bien à des mélanges pouvant contenir à la fois les molécules mères de pesticides mais également quelques uns de leurs produits de dégradation. Cela a été le cas de la solution de pulvérisation de boscalide et de thiaméthoxame dans lesquelles des composés répertoriés comme métabolites ont été détectés.

Certains chercheurs rappellent que « The formulation makes the honeybee poison » (165). Selon eux, les adjuvants contenus dans les formulations commerciales pourraient également jouer un rôle dans la dégradation de la santé des abeilles, d'où l'intérêt d'étendre les recherches vers l'évaluation de la contamination des abeilles par ces produits ainsi que de l'impact sur leur santé.

D'une manière générale, les recherches doivent se tourner vers l'approfondissement des connaissances, à la fois sur les effets des métabolites produits au sein des abeilles après contact ou ingestion, et sur l'identité et les effets des adjuvants contenus dans les formulations commerciales sur les abeilles.

Conclusions générales et perspectives

1. Conclusions générales

Ce projet avait pour principaux objectifs 1) le développement d'une extraction de 13 pesticides dans la cire d'abeille afin de 2) établir un état des lieux de la contamination de ruchers français (via l'analyse de cire, abeille et pain d'abeille), et 3) l'identification de métabolites de pesticides dans l'abeille.

La première partie de ce travail avait donc pour ambition de développer une méthode analytique basée sur la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse, pour évaluer la présence de pesticides de la famille des néonicotinoïdes, des pyréthriinoïdes et du boscalide dans la cire d'abeille.

L'extraction des trois familles de pesticides dans la cire a consisté à comparer trois techniques d'extractions (LLE, SPE et dSPE). Cela a permis de mettre au point un protocole basé sur la technique dSPE, suivie d'une analyse par UPLC-MS/MS. Cette méthode efficace et sensible a permis des rendements d'extraction compris entre 72 % et 116 %, et des LOQ allant de 1 ng.g⁻¹ à 40 ng.g⁻¹.

Cette méthode a été appliquée à des échantillons de cire d'abeille obtenus grâce à la collaboration d'associations apicoles (ADARA et FNOSAD). Les résultats des échantillons de cire, combinés à ceux obtenus pour les abeilles et le pain d'abeille des mêmes ruchers, a permis une estimation de la présence globale de ces pesticides au sein des ruchers français.

Ces analyses ont mis en évidence certaines tendances. Ainsi, le pain d'abeille apparaît comme la matrice la plus contaminée (77% d'échantillons positifs), devant la cire (61 % d'échantillons positifs) et les abeilles (38 % d'échantillons positifs). En ce qui concerne les concentrations, la cire est la matrice présentant les plus fortes concentrations (jusqu'à 302,3 ng.g⁻¹ obtenue pour le boscalide). Il a également été remarqué qu'un effet positif se dégage de la loi de restriction de l'utilisation des néonicotinoïdes en France, notamment concernant le pain d'abeille.

La seconde partie de ce travail à été consacrée à la mise en œuvre d'une méthode innovante de recherche de métabolites de pesticides dans l'abeille – métabolites préalablement générés par des expériences *in vitro* et *in vivo* grâce à la collaboration avec l'équipe d'écotoxicologues de l'INRA d'Avignon (UMR 406 Abeilles et Environnement).

Deux stratégies complémentaires de recherche de métabolites ont été mises en place, toutes deux reposant sur la chromatographie en phase liquide couplée à la spectromé-

trie de masse à haute résolution. L'une des approches est basée sur la recherche des rapports m/z des métabolites connus, répertoriés dans la littérature. L'autre approche est, quant à elle, basée sur la recherche de profils isotopiques particuliers dus à la présence d'atomes de chlore, de brome ou de soufre.

Finalement, l'application de ces protocoles de recherche aux échantillons *in vitro* et *in vivo* a permis d'identifier, à des niveaux de confiance variables, 9 métabolites et 5 marqueurs d'exposition :

- boscalide : 5 métabolites et 4 marqueurs d'exposition,
- thiaméthoxame : 1 métabolite et 1 marqueur d'exposition,
- thiaclopride : 2 métabolites,
- deltaméthrine : 1 métabolite

Après synthèse d'un métabolite du boscalide et de marqueurs d'exposition, ces derniers ont été recherchés dans des échantillons d'abeilles issues de ruchers symptomatiques. Ces analyses ont révélé la présence du métabolite hydroxylé du boscalide dans 30 % des échantillons, à des concentrations comprises entre 1,4 et 36,3 ng.g^{-1} . De plus, la présence de deux des marqueurs d'exposition (un produit de déshalogénéation et un de substitution d'un chlore par un hydroxyle) a également été révélée.

Les défis analytiques relevés lors de ce projet de thèse ont donc permis des avancées, notamment dans l'évaluation de la présence des pesticides au sein des ruchers, mais également dans l'identification de certains de leurs métabolites, offrant ainsi de nouvelles connaissances à nos partenaires écotoxicologues et du monde apicole.

2. Perspectives

Il reste encore de nombreuses pistes à étudier d'un point de vue analytique pour comprendre les phénomènes de mortalités massives chez les abeilles.

L'évaluation de la toxicité des pesticides reste délicate et nécessite le développement de méthodes toujours plus performantes, notamment pour parvenir à des LOQ toujours plus basses.

De la même manière, l'effort analytique doit se poursuivre pour l'ensemble des matrices apicoles afin d'évaluer la pression chimique subie par les abeilles. Cependant, cet effort doit non seulement concerner les matrices apicoles, mais aussi les matrices présentes dans l'environnement direct des abeilles. Ainsi, Benuszak et al. (166) propo-

sent l'évaluation du « honey bee exposome » (exposome de l'abeille), en ajoutant par exemple l'analyse de l'air à proximité des ruches.

En parallèle, de nouveaux programmes de recherche doivent être développés afin de continuer à identifier et évaluer la toxicité, non seulement des métabolites de pesticides, mais également des adjuvants présents dans les solutions commerciales de pesticides. L'appui technique procuré par la chimie analytique à l'écotoxicologie permettra l'identification des métabolites de pesticides et ainsi la compréhension des modes d'action et du devenir des pesticides au sein de l'abeille.

Références

1. Gallai N, Salles J-M, Settele J, Vaissière BE. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecol Econ*. 2009;68(3):810-21.
2. vanEngelsdorp D, Meixner MD. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J Invertebr Pathol*. 2010;103, Supplement:S80-95.
3. Wiest L, Buleté A, Giroud B, Fratta C, Amic S, Lambert O, et al. 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. *J Chromatogr A*. 2011;1218(34):5743-56.
4. Le rôle des insectes dans la pollinisation - Office Pour les Insectes et leur Environnement (OPIE) [Internet]. [cité 12 août 2016]. Disponible sur: <http://www.calameo.com/read/000897415c29c767003c7>
5. Bourg S. Abeille et insecticides phytosanitaires. Université Paul Sabatier de Toulouse; 2006.
6. Clément H, Étienne B, Jean-Marie B, Paul B, Roch D, Gilles F, et al. Le traité rustica de l'Apiculture. Fleurus Éditions; 2012.
7. Smith KM, Loh EH, Rostal MK, Zambrana-Torrel CM, Mendiola L, Daszak P. Pathogens, pests, and economics: drivers of honey bee colony declines and losses. *Ecohealth*. 2013;10(4):434-45.

8. Ascher J. *Apis dorsata* [Internet]. 2014 [cité 13 août 2016]. Disponible sur: http://www.discoverlife.org/mp/20p?see=I_JSA4363&res=640&flags=subgenus
9. Roded N. *Apis florea* [Internet]. 2013. Disponible sur: https://species.wikimedia.org/wiki/Apis_florea#/media/File:Apis_florea_worker_1.jpg
10. Smith T. *Apis cerana* [Internet]. 2010 [cité 13 août 2016]. Disponible sur: <https://conservationbytes.com/tag/apis-cerana/>
11. Emonnot C, Guyon L, Viard L. L'anatomie de l'abeille [Internet]. [cité 8 déc 2016]. Disponible sur: <http://tpe-miel1s12.e-monsite.com/pages/schema-de-l-anatomie-de-l-abeille.html>
12. Vidal-Naquet N. Abeilles et biologie - Espérance de vie des abeilles [Internet]. Apivet.eu - Blog vétérinaire consacré à la pathologie apicole. Disponible sur: http://www.apivet.eu/abeilles_et_biologie/
13. Johnson RM. Honey Bee Toxicology. *Annu Rev Entomol.* 2015;60(1):415.
14. Fischer D, Moriarty T. Pesticide Risk Assessment for Pollinators [Internet]. Wiley-Blackwell; 2014 [cité 17 août 2016]. Disponible sur: <http://eu.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-1118852524,subjectCd-LSC0.html>
15. Mutsaers M, van Blitterswijk H, van't Leven L, Kerkvliet J, van de Waerdt J. Bee products - Properties, processing and marketing [Internet]. Agromisa Knowledge Centre for Small Scale Sustainable Agriculture. 2005. Disponible sur: http://journeytoforever.org/farm_library/AD42.pdf
16. Delecroix D. Les ruchers du Perthois [Internet]. [cité 13 août 2016]. Disponible sur: <http://apid.over-blog.com/article-pain-d-abeille-114904274.html>
17. Huang Z. Écailles de cire [Internet]. [cité 13 août 2016]. Disponible sur: <http://abeilles.techno-science.ca/francais/les-abeilles/la-ruche-et-la-colonie/fabrication-cire.php>
18. Kouzayha A. Développement de méthodes analytiques pour la détection et la quantification de traces de HAP et de pesticides dans l'eau. Application à l'évaluation de la qualité des eaux libanaises. Université Bordeaux 1; 2011.
19. Rapport d'activité UIPP - 2010-2011 [Internet]. UIPP Union des industries de la protection des plantes; 2011 [cité 13 août 2016]. Disponible sur: <http://www.forumphyto.com/wp-content/uploads/2011/07/1106ActivitesUIPP.pdf>
20. Rapport d'activité UIPP - Repères 2015-2016 [Internet]. UIPP Union des industries de la protection des plantes; 2015 [cité 13 août 2016]. Disponible sur: <http://www.uipp.org/Boite-a-outils/Rapport-d-activite>

21. Plan ECOPHYTO II [Internet]. 2015. Disponible sur: http://agriculture.gouv.fr/sites/minagri/files/151022_ecophyto.pdf
22. Kasiotis KM, Anagnostopoulos C, Anastasiadou P, Machera K. Pesticide residues in honeybees, honey and bee pollen by LC–MS/MS screening: Reported death incidents in honeybees. *Sci Total Environ.* juillet 2014;485–486:633-42.
23. Malhat FM, Haggag MN, Loutfy NM, Osman MAM, Ahmed MT. Residues of organochlorine and synthetic pyrethroid pesticides in honey, an indicator of ambient environment, a pilot study. *Chemosphere.* 2015;120:457-61.
24. Panseri S, Catalano A, Giorgi A, Arioli F, Procopio A, Britti D, et al. Occurrence of pesticide residues in Italian honey from different areas in relation to its potential contamination sources. *Food Control.* 2014;38:150-6.
25. Pareja L, Colazzo M, Pérez-Parada A, Niell S, Carrasco-Letelier L, Besil N, et al. Detection of pesticides in active and depopulated beehives in Uruguay. *Int J Environ Res Public Health.* 2011;8(10):3844-58.
26. David A, Botías C, Abdul-Sada A, Nicholls E, Rotheray EL, Hill EM, et al. Widespread contamination of wildflower and bee-collected pollen with complex mixtures of neonicotinoids and fungicides commonly applied to crops. *Environ Int.* 2016;88:169-78.
27. Smodis Skerl MI, Velikonja Bolta S, Basa Cesnik H, Gregorc A. Residues of Pesticides in honeybee (*Apis mellifera carnica*) bee bread and in pollen loads from treated apple orchards. *Bull Environ Contam Toxicol.* 2009;83(3):374-7.
28. Lambert O, Piroux M, Puyo S, Thorin C, L’Hostis M, Wiest L, et al. Widespread occurrence of chemical residues in beehive matrices from apiaries located in different landscapes of Western France. *PloS One.* 2013;8(6):e67007.
29. Chauzat M-P, Faucon J-P. Pesticide residues in beeswax samples collected from honey bee colonies (*Apis mellifera* L.) in France. *Pest Manag Sci.* 2007;63(11):1100-6.
30. van der Sluijs JP, Simon-Delso N, Goulson D, Maxim L, Bonmatin J-M, Belzunces LP. Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services. *Curr Opin Environ Sustain.* sept 2013;5(3–4):293-305.
31. Jeschke P, Nauen R, Schindler M, Elbert A. Overview of the Status and Global Strategy for Neonicotinoids. *J Agric Food Chem.* 13 avr 2011;59(7):2897-908.
32. Bodereau-Dubois B. Récepteurs nicotiniqes neuronaux d’insectes et insecticides : caractérisation de facteurs cellulaires impliqués dans la modulation de l’efficacité des néonicotinoïdes [Internet]. Université d’Angers; 2011. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00679695/document>

33. Morrissey CA, Mineau P, Devries JH, Sanchez-Bayo F, Liess M, Cavallaro MC, et al. Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: A review. *Environ Int.* janv 2015;74:291-303.
34. Elbert A, Haas M, Springer B, Thielert W, Nauen R. Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. *Pest Manag Sci.* 1 nov 2008;64(11):1099-105.
35. Louat F. Étude des effets liés à l'exposition aux insecticides chez un insecte modèle, *Drosophila melanogaster*. Université d'Orléans; 2013.
36. Bass C, Denholm I, Williamson MS, Nauen R. The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Pestic Biochem Physiol.* 2015;121:78-87.
37. Williams GR, Troxler A, Retschnig G, Roth K, Yañez O, Shutler D, et al. Neonicotinoid pesticides severely affect honey bee queens. *Sci Rep.* 13 oct 2015;5:srep14621.
38. Pisa LW, Amaral-Rogers V, Belzunces LP, Bonmatin JM, Downs CA, Goulson D, et al. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environ Sci Pollut Res.* 1 janv 2015;22(1):68-102.
39. Exposition aux spécialités à base d'imidaclopride : synthèse des cas signalés aux centres antipoison français de 1999 à 2012 [Internet]. 2014. Disponible sur: http://www.centres-antipoison.net/cctv/imidaclopride_gt_phytoveille_vf.pdf
40. Garric A, Le Hir P. Les pesticides tueurs d'abeilles interdits en 2018... avec des dérogations. *LeMonde.fr.* 2016 [cité 14 août 2016]; Disponible sur: http://www.lemonde.fr/biodiversite/article/2016/06/22/les-deputes-se-prononcent-sur-l-epineux-dossier-des-pesticides-tueurs-d-abeilles_4956095_1652692.html
41. Al-Sayeda H. Transfert d'un insecticide systémique, l'imidaclopride, chez la tomate: implication du transport phloémien. *Institut National Polytechnique de Toulouse*; 2007.
42. E-Phy - Le catalogue des produits phytopharmaceutiques et de leurs usages, des matières fertilisantes et des supports de culture autorisés en France [Internet]. 2016. Disponible sur: <https://ephy.anses.fr>
43. Suchail S, Belzunces LP, Vaissière BE. Toxicité subchronique de l'imidaclopride et de ses métabolites chez l'abeille domestique *Apis mellifera*. 2003; Disponible sur: http://www.apiservices.com/abeille-de-france/articles/toxicite_subchronique.htm
44. Index-matphyto - Compilation des index Acta. 2008.
45. Willemin M-É. Modélisation de la toxicocinétique des isomères cis et trans de la perméthrine et de ses métabolites chez le rat et de leur métabolisme sur hépatocytes humains. Université de Technologie de Compiègne; 2014.

46. Kadala A. Action des pyréthrinoïdes sur le canal sodique activé par le potentiel des neurones du système olfactif de l'abeille domestique *Apis mellifera*. Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse; 2011.
47. Environmental health criteria 99 – Cyhalothrin [Internet]. IPCS INCHEM; Disponible sur: <http://incem.org/documents/ehc/ehc/ehc99>
48. Avis aux fabricants, distributeurs et utilisateurs de produits phytopharmaceutiques concernant le retrait des préparations contenant les substances actives considérées comme préoccupantes et les délais d'écoulement octroyés pour leur distribution et leur utilisation [Internet]. [cité 15 août 2016]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000023329109>
49. von G M, M N, V A. Pesticide Chemistry. Elsevier. 1988.
50. van der Sluijs JP, Simon-Delso N, Goulson D, Maxim L, Bonmatin J-M, Belzunces LP. Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services. *Curr Opin Environ Sustain*. 2013;5(3–4):293-305.
51. vanEngelsdorp D, Evans JD, Saegerman C, Mullin C, Haubruge E, Nguyen BK, et al. Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study. *PLoS ONE*. 2009;4(8):e6481.
52. Goulson D, Nicholls E, Botías C, Rotheray EL. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*. 2015;347(6229):1255-957.
53. Simon-Delso N, San Martin G, Bruneau E, Minsart L-A, Mouret C, Hautier L. Honeybee colony disorder in crop areas: the role of pesticides and viruses. *PloS One*. 2014;9(7):e103073.
54. Ramade F. Introduction à l'écotoxicologie: Fondements et applications. Lavoisier; 2007.
55. Universalis E. TOXICOLOGIE [Internet]. Encyclopædia Universalis. [cité 16 août 2016]. Disponible sur: <http://www.universalis.fr/encyclopedie/toxicologie/>
56. Notions de toxicologie - Commission des normes, de l'équité, de la santé et de la sécurité du travail (Quebec) [Internet]. Disponible sur: <http://www.csst.qc.ca/prevention/reptox/toxicologie/notions-toxicologie/Pages/06-dose-relations-toxiques.aspx>
57. Renzi MT. Effects of pesticides on honey bees (*Apis mellifera* L.): a study of a specific route of exposure and evaluation of biochemical-physiological changes in the assessment of the pesticides toxicity. Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse - Università di Bologna; 2013.
58. Silbergeld EK. La toxicologie. In: Encyclopédie de sécurité et de santé au tra-

- vail - Bureau international du travail [Internet]. Disponible sur: <http://www.ilo.org/fr/documents/ilo033.htm>
59. Viau C, Tardif R. Toxicologie. In: Environnement et santé publique - Fondements et pratiques [Internet]. Edisem / Tech & Doc, Acton Vale / Paris; 2003. p. 119-43. Disponible sur: <http://www.dsest.umontreal.ca/documents/11Chap05.pdf>
60. Lapointe G. Notions de toxicologie [Internet]. Commission de la santé et de la sécurité au travail; 2004. Disponible sur: http://www.cnesst.gouv.qc.ca/Publications/200/Documents/dc_200_348.pdf
61. Définition d'un toxique et forme d'intoxication [Internet]. Université de Nantes; Disponible sur: http://ued.univ-nantes.fr/sequence3/html/chap1_part4_1
62. Lepage G. Évaluation de la toxicité d'un polluant [Internet]. 2008 [cité 15 août 2016]. Disponible sur: slideplayer.fr/slide/182899
63. Fagin D. Toxicology: The learning curve. *Nature*. 2012;490(7421):462-5.
64. Suchail S, Guez D, Belzunces LP. Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environ Toxicol Chem*. 1 nov 2001;20(11):2482-6.
65. Aufauvre J, Biron DG, Vidau C, Fontbonne R, Roudel M, Diogon M, et al. Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. *Sci Rep* [Internet]. 2012 [cité 16 août 2016];2. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3310228/>
66. Zhu YC, Yao J, Adamczyk J, Luttrell R. Synergistic toxicity and physiological impact of imidacloprid alone and binary mixtures with seven representative pesticides on honey bee (*Apis mellifera*). *PLOS ONE*. mai 2017;12(5):e0176837.
67. Thompson HM, Fryday SL, Harkin S, Milner S. Potential impacts of synergism in honeybees (*Apis mellifera*) of exposure to neonicotinoids and sprayed fungicides in crops. *Apidologie*. 1 sept 2014;45(5):545-53.
68. Charpentier G. Étude des effets létaux et sub-létaux d'une intoxication au thymol sur le développement et l'immunité des larves d'*Apis mellifera* élevées in vitro. Université de Toulouse; 2013.
69. Zhou T, Zhou W, Wang Q, Dai P-L, Liu F, Zhang Y-L, et al. Effects of pyrethroids on neuronal excitability of adult honeybees *Apis mellifera*. *Pestic Biochem Physiol*. 2011;100(1):35-40.
70. Artz DR, Pitts-Singer TL. Effects of Fungicide and Adjuvant Sprays on Nesting Behavior in Two Managed Solitary Bees, *Osmia lignaria* and *Megachile rotundata*. *PLoS ONE* [Internet]. 14 août 2015 [cité 9 juin 2017];10(8). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4537283/>

71. Sprayberry JDH, Ritter KA, Riffell JA. The Effect of Olfactory Exposure to Non-Insecticidal Agrochemicals on Bumblebee Foraging Behavior. *PLOS ONE*. 24 oct 2013;8(10):e76273.
72. Mussen EC, Lopez JE, Peng CYS. Effects of Selected Fungicides on Growth and Development of Larval Honey Bees, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *Environ Entomol*. 1 oct 2004;33(5):1151-4.
73. Ladurner E, Bosch J, Kemp WP, Maini S. Assessing delayed and acute toxicity of five formulated fungicides to *Osmia lignaria* Say and *Apis mellifera*. *Apidologie*. 1 juill 2005;36(3):449-60.
74. Vandame R, Belzunces LP. Joint actions of deltamethrin and azole fungicides on honey bee thermoregulation. *Neurosci Lett*. 1998;251(1):57-60.
75. Yoder JA, Jajack AJ, Rosselot AE, Smith TJ, Yerke MC, Sammataro D. Fungicide contamination reduces beneficial fungi in bee bread based on an area-wide field study in honey bee, *Apis mellifera*, colonies. *J Toxicol Environ Health A*. 2013;76(10):587-600.
76. Base de donnée Agritox [Internet]. [cité 16 août 2016]. Disponible sur: <http://www.agritox.anses.fr/index.php>
77. Base de donnée - Observatoire des pesticides [Internet]. [cité 16 août 2016]. Disponible sur: <http://observatoire-pesticides.gouv.fr/index.php?pageid=244>
78. Base de donnée - SAgE pesticides [Internet]. [cité 16 août 2016]. Disponible sur: sagepesticides.qc.ca
79. Jabot C, Daniele G, Giroud B, Tchamitchian S, Belzunces LP, Casabianca H, et al. Detection and quantification of boscalid and its metabolites in honeybees. *Chemosphere*. 2016;156:245-51.
80. García-Valcárcel AI, Molero E, Tadeo JL, Hernando MD. Determination of selected environmental contaminants in foraging honeybees. *Talanta*. 1 févr 2016;148:1-6.
81. Hladik ML, Vandever M, Smalling KL. Exposure of native bees foraging in an agricultural landscape to current-use pesticides. *Sci Total Environ*. 15 janv 2016;542:469-77.
82. Bernal JL, del Nozal MJ, Toribio L, Jiménez JJ, Atienza J. High-performance liquid chromatographic determination of benomyl and carbendazim residues in apian samples. *J Chromatogr A*. 1997;787(1-2):129-36.
83. Codling G, Al Naggar Y, Giesy JP, Robertson AJ. Concentrations of neonicotinoid insecticides in honey, pollen and honey bees (*Apis mellifera* L.) in central Saskatchewan, Canada. *Chemosphere*. févr 2016;144:2321-8.

84. Mullin CA, Frazier M, Frazier JL, Ashcraft S, Simonds R, vanEngelsdorp D, et al. High Levels of Miticides and Agrochemicals in North American Apiaries: Implications for Honey Bee Health. *PLoS ONE*. 2010;5(3):e9754.
85. Li Y, Kelley RA, Anderson TD, Lydy MJ. Development and comparison of two multi-residue methods for the analysis of select pesticides in honey bees, pollen, and wax by gas chromatography–quadrupole mass spectrometry. *Talanta*. 2015;140:81-7.
86. Kiljanek T, Niewiadowska A, Semeniuk S, Gawel M, Borzęcka M, Posyniak A. Multi-residue method for the determination of pesticides and pesticide metabolites in honeybees by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry—Honeybee poisoning incidents. *J Chromatogr A*. 26 févr 2016;1435:100-14.
87. Paola Fidente SS. Analysis of nicotinoid insecticides residues in honey by solid matrix partition clean-up and liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2005;1094(1-2):175-8.
88. Campillo N, Peñalver R, Aguinaga N, Hernández-Córdoba M. Solid-phase microextraction and gas chromatography with atomic emission detection for multiresidue determination of pesticides in honey. *Anal Chim Acta*. 9 mars 2006;562(1):9-15.
89. Martel A-C, Zeggane S, Aurières C, Drajnudel P, Faucon J-P, Aubert M. Acaricide residues in honey and wax after treatment of honey bee colonies with Apivar[®] or Asuntol[®] 50. *Apidologie*. 2007;38(6):534-44.
90. Rodríguez López D, Ahumada DA, Díaz AC, Guerrero JA. Evaluation of pesticide residues in honey from different geographic regions of Colombia. *Food Control*. 1 mars 2014;37:33-40.
91. de Oliveira RC, Queiroz SC do N, da Luz CFP, Porto RS, Rath S. Bee pollen as a bioindicator of environmental pesticide contamination. *Chemosphere*. 1 nov 2016;163:525-34.
92. Vázquez PP, Lozano A, Uclés S, Ramos MMG, Fernández-Alba AR. A sensitive and efficient method for routine pesticide multiresidue analysis in bee pollen samples using gas and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 24 déc 2015;1426:161-73.
93. Niell S, Cesio V, Hepperle J, Doerk D, Kirsch L, Kolberg D, et al. QuE-ChERS-based method for the multiresidue analysis of pesticides in beeswax by LC-MS/MS and GC×GC-TOF. *J Agric Food Chem*. 2014;62(17):3675-83.
94. Orantes-Bermejo FJ, Gómez Pajuelo A, Megías Megías M, Fernández-Piñar CT. Pesticide residues in beeswax and beebread samples collected from honey bee colonies (*Apis mellifera* L.) in Spain. Possible implications for bee losses. *J Apic Res*.

2010;49(3):243.

95. Yanez KP, Bernal JL, Nozal MJ, Martin MT, Bernal J. Determination of seven neonicotinoid insecticides in beeswax by liquid chromatography coupled to electrospray-mass spectrometry using a fused-core column. *J Chromatogr A*. 2013;1285:110-7.

96. Giroud B, Vauchez A, Vulliet E, Wiest L, Buleté A. Trace level determination of pyrethroid and neonicotinoid insecticides in beebread using acetonitrile-based extraction followed by analysis with ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2013;1316:53-61.

97. González-Martín MI, Revilla I, Vivar-Quintana AM, Betances Salcedo EV. Pesticide residues in propolis from Spain and Chile. An approach using near infrared spectroscopy. *Talanta*. 1 avr 2017;165:533-9.

98. Oellig C. Acetonitrile extraction and dual-layer solid phase extraction clean-up for pesticide residue analysis in propolis. *J Chromatogr A*. 6 mai 2016;1445:19-26.

99. Karazafiris E, Menkissoglu-Spiroudi U, Thrasyvoulou A. New multiresidue method using solid-phase extraction and gas chromatography-micro-electron-capture detection for pesticide residues analysis in royal jelly. *J Chromatogr A*. 2008;1209(1-2):17-21.

100. Bonzini S, Tremolada P, Bernardinelli I, Colombo M, Vighi M. Predicting pesticide fate in the hive (part 1): experimentally determined tau-fluvalinate residues in bees, honey and wax. *Apidologie*. 2011;42(3):378-90.

101. Adamczyk S, Lázaro R, Pérez-Arquillué C, Herrera A. Determination of synthetic acaricides residues in beeswax by high-performance liquid chromatography with photodiode array detector. *Anal Chim Acta*. 2007;581(1):95-101.

102. Lodesani M, Costa C, Serra G, Colombo R, Sabatini AG. Acaricide residues in beeswax after conversion to organic beekeeping methods. *Apidologie*. 2008;39(3):324-33.

103. Leníček J, Sekyra M, Novotná AR, Vášová E, Titěra D, Veselý V. Solid phase microextraction and gas chromatography with ion trap detector (GC-ITD) analysis of amitraz residues in beeswax after hydrolysis to 2,4-dimethylaniline. *Anal Chim Acta*. juin 2006;571(1):40-4.

104. Tsigouri A, Menkissoglu-Spiroudi U, Thrasyvoulou AT, Diamantidis GC. Determination of fluvalinate residues in beeswax by gas chromatography with electron-capture detection. *J AOAC Int*. 2000;83(5):1225-8.

105. Bogdanov S. Determination of acaricide residues in beeswax: collaborative study [Internet]. 2003 [cité 28 mai 2015]. Disponible sur:

<http://www.agroscope.admin.ch/publikationen/einzelpublikation/index.html?lang=fr&aid=10337&pid=11042>

106. Korta E, Bakkali A, Berrueta LA, Gallo B, Vicente F, Bogdanov S. Determination of amitraz and other acaricide residues in beeswax. *Anal Chim Acta*. 2003;475(1-2):97-103.

107. Jiménez JJ, Bernal JL, del Nozal MJ, Alonso C. Liquid-liquid extraction followed by solid-phase extraction for the determination of lipophilic pesticides in beeswax by gas chromatography-electron-capture detection and matrix-matched calibration. *J Chromatogr A*. 3 sept 2004;1048(1):89-97.

108. Tene N. Recherche de résidus de pesticides dans la cire d'abeille : comparaison entre les cires de corps et d'opercules. 2009.

109. Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, Schenck FJ. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and « dispersive solid-phase extraction » for the determination of pesticide residues in produce. *J AOAC Int*. 2003;86(2):412-31.

110. Farajzadeh MA, Khoshmaram L, Nabil AAA. Determination of pyrethroid pesticides residues in vegetable oils using liquid-liquid extraction and dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-flame ionization detection. *J Food Compos Anal*. 2014;34(2):128-35.

111. Meneghini LZ, Rübensam G, Bica VC, Ceccon A, Barreto F, Ferrão MF, et al. Multivariate optimization for extraction of pyrethroids in milk and validation for GC-ECD and CG-MS/MS analysis. *Int J Environ Res Public Health*. 2014;11(11):11421-37.

112. Koch DA [b1] (analytic), Clark K [b2] (analytic), Tessier DM [b3] (analytic). Quantification of Pyrethroids in Environmental Samples Using NCI-GC-MS with Stable Isotope Analogue Standards (English). In: *J agric food chem* (Print). American Chemical Society, Washington, DC; 2012. p. 2330-9.

113. You J, Lydy MJ. A solution for isomerization of pyrethroid insecticides in gas chromatography. *J Chromatogr A*. 2007;1166(1-2):181-90.

114. Valverde A, Aguilera A, Rodríguez M, Boulaïd M. What are we determining using gas chromatographic multiresidue methods: tralomethrin or deltamethrin? *J Chromatogr A*. 2002;943(1):101-11.

115. Sanchez-Bayo F, Goka K. Pesticide Residues and Bees – A Risk Assessment. *PLOS ONE*. avr 2014;9(4):e94482.

116. Jovanov P, Guzsvány V, Franko M, Lazić S, Sakač M, Šarić B, et al. Multi-residue method for determination of selected neonicotinoid insecticides in honey using

optimized dispersive liquid–liquid microextraction combined with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Talanta*. 2013;111:125-33.

117. Munitz MS, Resnik SL, Montti MIT. Method development and validation for boscalid in blueberries by solid-phase microextraction gas chromatography, and their degradation kinetics. *Food Chem*. 2013;136(3–4):1399-404.

118. Lagunas-Allué L, Sanz-Asensio J, Martínez-Soria M-T. Optimization and validation of a simple and fast method for the determination of fungicides in must and wine samples by SPE and GC/MS. *J AOAC Int*. 2012;95(5):1511-9.

119. de Oliveira Silva R, de Castro RC, Milhome MAL, do Nascimento RF. Liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry method for determination of twenty multi-class pesticide residues in cashew. *LWT - Food Sci Technol*. 2014;59(1):21-5.

120. Camilleri J. Développement, validation et application terrain de méthodes sensibles d'échantillonnage et d'analyse de perturbateurs endocriniens et composés pharmaceutiques dans des eaux de surface et des sédiments [Internet]. 2013 [cité 21 juin 2015]. Disponible sur: <http://www.theses.fr/s102001>

121. M. Hawkridge A. CHAPTER 1 Practical Considerations and Current Limitations in Quantitative Mass Spectrometry-based Proteomics. 2014;1-25.

122. Uchida Y, Tachikawa M, Obuchi W, Hoshi Y, Tomioka Y, Ohtsuki S, et al. A study protocol for quantitative targeted absolute proteomics (QTAP) by LC-MS/MS: application for inter-strain differences in protein expression levels of transporters, receptors, claudin-5, and marker proteins at the blood-brain barrier in ddY, FVB, and C57BL/6J mice. *Fluids Barriers CNS*. 2013;10(1):21.

123. Kruve A, Rebane R, Kipper K, Oldekop M-L, Evard H, Herodes K, et al. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I. *Anal Chim Acta*. 2015;870:29-44.

124. ICH Harmonized tripartite guideline: validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1), International Conference of Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. 2005.

125. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Matrix effect in quantitative LC/MS/MS analyses of biological fluids: a method for determination of finasteride in human plasma at picogram per milliliter concentrations. *Anal Chem*. 1 mars 1998;70(5):882-9.

126. Jabot C, Fieu M, Giroud B, Buleté A, Casabianca H, Vulliet E. Trace-level determination of pyrethroid, neonicotinoid and carboxamide pesticides in beeswax using dispersive solid-phase extraction followed by ultra-high-performance liquid

chromatography-tandem mass spectrometry. *Int J Environ Anal Chem.* 2015;95(3):240-57.

127. Frison S, Breitzkreitz W, Currie R, Nelson D, Sporns P. The analysis of fluvinate in beeswax using GC/MS. *Food Res Int.* 1999;32(1):35-41.

128. Martel A-C, Zeggane S. Determination of acaricides in honey by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *J Chromatogr A.* 2002;954(1-2):173-80.

129. Kamel A. 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). *J Agric Food Chem.* 26 mai 2010;58(10):5926-31.

130. Gbylik-Sikorska M, Sniegocki T, Posyniak A. Determination of neonicotinoid insecticides and their metabolites in honey bee and honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B.* 2015;990:132-40.

131. Herrera López S, Lozano A, Sosa A, Hernando MD, Fernández-Alba AR. Screening of pesticide residues in honeybee wax comb by LC-ESI-MS/MS. A pilot study. *Chemosphere.* nov 2016;163:44-53.

132. Commission Européenne - Règlement d'exécution N° 485/2013 relatif à la modification des conditions d'approbation des substances actives clothianidine, thiaméthoxame et imidaclopride, et interdisant la vente de semences traitées avec des produits phytopharmaceutiques contenant ces substances actives [Internet]. 2013 [cité 30 avr 2017]. Disponible sur: http://eur-lex.europa.eu/eli/reg_impl/2013/485/oj

133. Sandrock C, Tanadini LG, Pettis JS, Biesmeijer JC, Potts SG, Neumann P. Sublethal neonicotinoid insecticide exposure reduces solitary bee reproductive success. *Agric For Entomol.* 1 mai 2014;16(2):119-28.

134. Charreton M, Decourtye A, Henry M, Rodet G, Sandoz J-C, Charnet P, et al. A Locomotor Deficit Induced by Sublethal Doses of Pyrethroid and Neonicotinoid Insecticides in the Honeybee *Apis mellifera*. *PLOS ONE.* déc 2015;10(12):e0144879.

135. Evans G. A handbook of bioanalysis and drug metabolism. CRC Press. 2004.

136. Coelho A. Rôle des cytochromes P450 dans la perception sensorielle et le métabolisme de la caféine chez *Drosophila melanogaster*. Université de Bourgogne; 2014.

137. Jacques C. Étude de la diffusion et du métabolisme cutané de xénobiotiques sur la peau d'oreille de porc maintenue en survie par comparaison avec le foie. Université de Toulouse; 2010.

138. Poupardin R. Interactions gènes-environnement chez les moustiques et leur impact sur la résistance aux insecticides. Université de Grenoble; 2011.

139. Berenbaum MR, Johnson RM. Xenobiotic detoxification pathways in honey bees. *Curr Opin Insect Sci.* août 2015;10:51-8.
140. Fairbrother A, Purdy J, Anderson T, Fell R. Risks of neonicotinoid insecticides to honeybees. *Environ Toxicol Chem SETAC.* 2014;33(4):719-31.
141. Nassar AF. Biotransformation and metabolite elucidation of xenobiotics. Wiley. 2010.
142. Kostianen R, Kotiaho T, Kuuranne T, Auriola S. Liquid chromatography/atmospheric pressure ionisation-mass spectrometry in drug metabolism studies. *J Mass Spectrom.* 2003;38:357-72.
143. Campbell NA. *Biology.* Pearson; 2005.
144. Picard N. Études in vitro et in vivo du métabolisme du mycophénolate et des interactions métaboliques entre médicaments immunosuppresseurs. Université de Limoges; 2005.
145. Sumner LW, Amberg A, Barret D, Beale MH, Beger R, Daykin CA, et al. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis - Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standard Initiative (MSI) Sumner, Lloyd W. and Amberg, Alexander and Barret, Dave and Beale, Michael H. and Beger, Richard and Daykin, Clare A. and Fan, Teresa W.-M. and Fiehn, Oliver and Goodacre, Royston and Griffin, Julian and Hankemeier, Thomas and Hardy, Nigel and Harnly, James. *Metabolomics.* 2007;3:211--221.
146. Schymanski E, Jeon J, Gulde R, Fenner K, Ruff M, Singer H, et al. Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: communicating confidence. *Environ Sci Technol.* 2014;48:2097-8.
147. Boily M, Sarrasin B, Deblois C, Aras P, Chagnon M. Acetylcholinesterase in honey bees (*Apis mellifera*) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate: laboratory and field experiments. *Environ Sci Pollut Res Int.* août 2013;20(8):5603-14.
148. Ibrahim M. Recherche de biomarqueurs d'exposition et d'effet à des cancérigènes de l'environnement par spectrométrie de masse [Internet]. Université de Strasbourg et Université Libanaise; 2013 [cité 6 juin 2017]. Disponible sur: https://www.google.fr/search?client=safari&rls=en&q=RECHERCHE+DE+BIOMARQUEURS+D%E2%80%99EXPOSITION+ET+D%E2%80%99EFFET+A%CC%80+DES+CANCE%CC%81RIGE%CC%80NES+DEL%E2%80%99ENVIRONNEMENT+PAR+SPECTROME%CC%81TRIE+DE+MASSE&ie=UTF-8&oe=UTF-8&gfe_rd=cr&ei=bcI2WdmuHqis8wfBvJ-gAg
149. Tolonen A, Turpeinen M, Pelkonen O. Liquid chromatography-mass spectrometry in *in vitro* drug metabolite screening. *Drug Discov Today.*

2009;14:120-33.

150. Dunn WB, Erban A, Weber RJM, Creek DJ, Brown M, Breitling R, et al. Mass appeal: metabolite identification in mass spectrometry-focused untargeted metabolomics. *Metabolomics*. 2013;9:S44--S66.

151. Horai H, Arita M, Kanaya S, Nihei Y, Ikeda T, Suwa K, et al. MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *J Mass Spectrom JMS*. juill 2010;45(7):703-14.

152. McGregor DB, Solecki R. Pesticide residues in food - 2006 (FAO/WHO) - Part II Toxicological [Internet]. [cité 27 mars 2017]. Disponible sur: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43822/1/9789241665223_eng.pdf

153. Lohmann W, Dötzer R, Gütter G, Van Leeuwen SM, Karst U. On-Line Electrochemistry/Liquid Chromatography/Mass Spectrometry for the Simulation of Pesticide Metabolism. *J Am Soc Mass Spectrom*. janv 2009;20(1):138-45.

154. Yibing H. Boscalid (221) evaluation - FAO [Internet]. [cité 27 mars 2017]. Disponible sur: http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JM PR/Evaluation09/Boscalid.pdf

155. Lagunas-Allue L, Martinez-Soria M-T, Sanz-Asensio J, Salvador A, Ferronato C, Chovelon JM. Photocatalytic degradation of boscalid in aqueous titanium dioxide suspension: Identification of intermediates and degradation pathways. *Appl Catal B-Environ*. 1 août 2010;98(3-4):122-31.

156. Hamilton D. Thiamethoxam (245) evaluation - FAO [Internet]. [cité 27 mars 2017]. Disponible sur: http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JM PR/Evaluation10/Thiamethoxam.pdf

157. Sieke C. Tiacloprid (223) evaluation - FAO [Internet]. [cité 27 mars 2017]. Disponible sur: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1127e/a1127e12.pdf>

158. Ge F, Zhou L-Y, Wang Y, Ma Y, Zhai S, Liu Z-H, et al. Hydrolysis of the neonicotinoid insecticide thiacloprid by the N₂-fixing bacterium *Ensifer meliloti* CGMCC 7333. *Int Biodeterior Biodegrad*. 2014;93:10-7.

159. MacLachlan D. Deltamethrin (135) evaluation - FAO [Internet]. [cité 27 mars 2017]. Disponible sur: http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JM PR/Evaluation02/DELTAMETHRINEvaluationjja.pdf

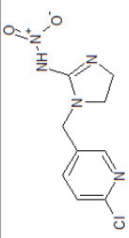
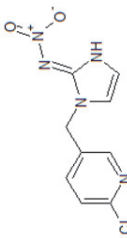
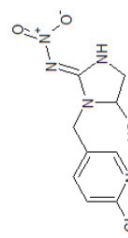
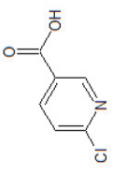
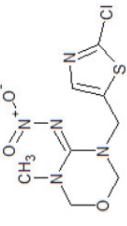
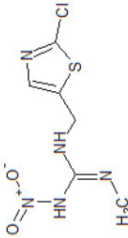
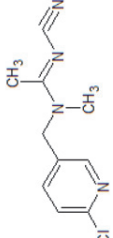
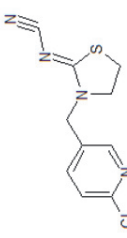
160. Sieke C. Lambda-cyhalothrine (146) evaluation - FAO [Internet]. [cité 27 mars 2017]. Disponible sur:

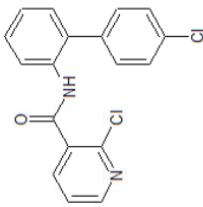
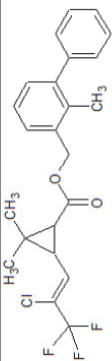
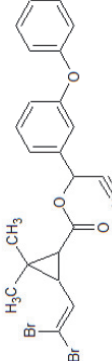
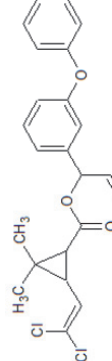
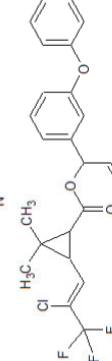
http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JM-PR/Evaluation08/Lambda-cyhalotrhin.pdf

161. Poquet Y. Approche revisitée de l'évaluation du risque présenté par les pesticides pour l'abeille *Apis mellifera* L. : Caractérisation de l'exposition et de la réponse biologique consécutives aux traitements par pulvérisation [Internet]. Aix-Marseille; 2015 [cité 5 avr 2017]. Disponible sur: <http://www.theses.fr/2015AIXM4019>
162. Poquet Y, Bodin L, Tchamitchian M, Fusellier M, Giroud B, Lafay F, et al. A Pragmatic Approach to Assess the Exposure of the Honey Bee (*Apis mellifera*) When Subjected to Pesticide Spray. *PLOS ONE*. 20 nov 2014;9(11):e113728.
163. Fasinu P, Bouic PJ, Rosenkranz B. Liver-based in vitro technologies for drug biotransformation studies - a review. *Curr Drug Metab*. févr 2012;13(2):215-24.
164. Pérez JJ, Harris GA, Chipuk JE, Brodbelt JS, Green MD, Hampton CY, et al. Transmission-mode direct analysis in real time and desorption electrospray ionization mass spectrometry of insecticide-treated bednets for malaria control. *Analyst*. 22 mars 2010;135(4):712-9.
165. Mullin CA, Chen J, Fine JD, Frazier MT, Frazier JL. The formulation makes the honey bee poison. *Pestic Biochem Physiol*. 2015;120:27-35.
166. Benuszak J, Laurent M, Chauzat M-P. The exposure of honey bees (*Apis mellifera*; Hymenoptera: Apidae) to pesticides: Room for improvement in research. *Sci Total Environ*. 1 juin 2017;587:423-38.

Annexes

Annexe 1. Composés étudiés

Famille	Substance active	Numéro CAS	Formule brute	Structure	PM (g.mol ⁻¹)	Log K _{ow}
	Imidaclopride	138261-41-3	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂		255,66	0,57 (70)
	Oléfine-imidaclopride	115086-54-9	C ₉ H ₈ ClN ₅ O ₂		253,65	/
	5-hydroxy-imidaclopride	/	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₃		270,65	/
	Acide-6-chloronicotinique	5326-23-8	C ₆ H ₄ ClNO ₂		157,55	/
Néonicotinoïde	Thiaméthoxame	153719-23-4	C ₈ H ₁₀ ClN ₅ O ₃ S		291,71	-0,13 (70)
	Clothianidine	210880-92-5	C ₆ H ₈ ClN ₅ O ₂ S		249,68	/
	Acétamipride	135410-20-7	C ₁₀ H ₁₁ ClN ₄		222,67	0,8 (70)
	Thiaclopride	111988-49-9	C ₁₀ H ₁₁ ClN ₃ S		252,72	1,26 (70)

Famille	Substance active	Numéro CAS	Formule brute	Structure	PM (g.mol ⁻¹)	Log K _{ow}
Carboxamide	Boscalide	188425-85-6	C ₁₈ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O		343,21	2,96 (70)
	Bifenthrine	82657-04-3	C ₂₃ H ₂₂ ClF ₃ O ₂		422,88	6,6 (70)
	Deltaméthrine	52918-63-5	C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃		505,20	4,6 (71)
Pyréthriinoïde	Cyperméthrine	52315-07-8	C ₂₂ H ₁₉ Cl ₂ NO ₃		416,30	6,6 (70)
	Lambda-cyhalothrine	91465-08-6	C ₂₃ H ₁₉ ClF ₃ NO ₃		449,90	7 (70)

Annexe 2. Liste des biotransformations

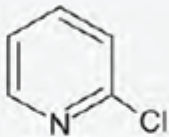
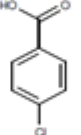
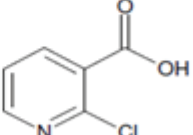
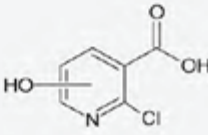
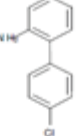
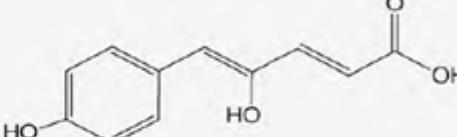
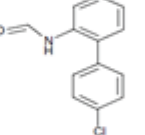
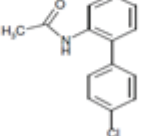
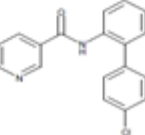
Nature	Molecular formula change	Mass shift (Da) (monoisotopic neutral mass)	Nominal neutral mass (Da)	Monoisotopic neutral mass (d'après Isotope patern Bruker)	Mass defect shift	
					Da	mDa
Conj. Co-enzyme A	+C ₂₁ H ₃₃ N ₇ O ₁₆ SP ₃ -OH	+749	749	749,1046	0,1046	104,6
	+C ₁₅ H ₂₂ N ₃ O ₁₆ P ₃	+621	621	621,0274	0,0274	27,4
Conj. Glucuronide	+C ₁₂ H ₁₆ O ₁₂	+352	352	352,064176	0,0642	64,2
Conj. GSH	+GSH+2O	+339	339	339,073636	0,0736	73,6
Conj. GSH	+GSH+2O-2H	+337	337	337,057986	0,0580	58,0
Conj. GSH	+GSH+CO-2H	+333	333	333,063071	0,0631	63,1
Conj. GSH	+GSH+O	+323	323	323,078721	0,0787	78,7
Conj. GSH	+GSH+O-2H	+321	321	321,063071	0,0631	63,1
Conj. GSH	+GSH+O-4H	+319	319	319,047421	0,0474	47,4
Conj. GSH	+GSH+O-CH ₂	+309	309	309,063071	0,0631	63,1
Conj. GSH	+GSH	+307	307	307,083806	0,0838	83,8
Conj. GSH	+GSH+O-NH-2H	+306	306	306,052172	0,0522	52,2
Conj. GSH	+GSH-2H	+305	305	305,068156	0,0682	68,2
Conj. GSH	+C ₁₀ H ₁₃ N ₃ O ₆ S	+303	303	303,052506	0,0525	52,5
Conj. GSH	+GSH+O-HF	+303	303	303,072493	0,0725	72,5
Conj. GSH	+GSH-C-2H	+293	293	293,068156	0,0682	68,2
Conj. GSH	+GSH-CH ₂ -2H	+291	291	291,052506	0,0525	52,5
Conj. GSH	+GSH-NH ₃	+290	290	290,057257	0,0573	57,3
Conj. GSH	+GSH, -H ₂ O	+289	289	289,0732	0,0732	73,2
Conj. GSH	+GSH+O-HCl	+287	287	287,102043	0,1020	102,0
Conj. GSH	+GSH+O-CH ₂ CO-2H	+279	279	279,052506	0,0525	52,5
Conj. GSH	+GSH-2N-4H	+275	275	275,046358	0,0464	46,4
Conj. GSH	+GSH-S-2H	+273	273	273,096085	0,0961	96,1
Conj. GSH	+GSH-HCl	+271	271	271,107128	0,1071	107,1
Conj. GSH	+Cys, +Glu, -H ₂ O	+250	250	250,062342	0,0623	62,3
Conj. Glucuronide	+C ₇ H ₈ O ₈	+220	220	220,0219	0,0219	21,9
Conj. Glucuronide	+C ₆ H ₈ O ₇	+192	192	192,027003	0,0270	27,0
Conj. Sulfate	+2 SO ₄	+192	192	191,9035	-0,0965	-96,5
Conj. GSH	+CysGly, -H ₂ O	+178	178	178,041212	0,0412	41,2
Conj. Glucuronide	+C ₆ H ₈ O ₆	+176	176	176,032088	0,0321	32,1
	+C ₆ H ₁₁ N ₂ O ₃ S, -OH	+174	174	174,0463	0,0463	46,3
Conj. CysOAc	+C ₅ H ₉ NO ₃ S	+163	163	163,030314	0,0303	30,3
Conj. Hexose	+hexose, -H ₂ O	+162	162	162,052823	0,0528	52,8
Conj. CysOAc	+C ₆ H ₇ NO ₃ S	+161	161	161,0147	0,0147	14,7
Conj. Sulfate	+6O, +2S	+160	160	159,913629	-0,0864	-86,4
Conj. Glucuronide	+C ₅ H ₈ O ₅	+148	148	148,037173	0,0372	37,2
Conj. Acyl carnitine	-H, +C ₇ H ₁₄ NO ₂	+143	143	143,0946	0,0946	94,6
Conj. Glu	-H ₂ O, +Gln	+128	128	128,0586	0,0586	58,6
Conj. Cys	+Cys	+121	121	121,019749	0,0197	19,7
Conj. S-Cys	+C ₃ H ₃ NO ₂ S	+119	119	119,004099	0,0041	4,1
Conj. Taurine	+C ₂ H ₃ NO ₂ S	+107	107	107,004099	0,0041	4,1
Conj. Cys	+Cys, -H ₂ O	+103	103	103,0092	0,0092	9,2
Conj. Sulfate	+4O, +S	+96	96	95,951729	-0,0483	-48,3
Conj. Sulfate	+SO ₃	+80	80	79,956815	-0,0432	-43,2
Conj. Phospho	+PO ₃	+79	79	78,958507	-0,0415	-41,5
Conj. Ala	+Ala, -H ₂ O	+71	71	71,037113	0,0371	37,1
Conj. Gly	+C ₂ H ₃ NO	+57	57	57,021464	0,0215	21,5

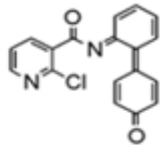
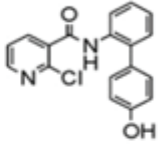
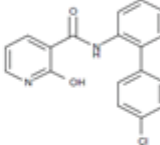
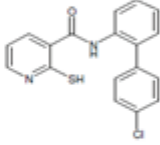
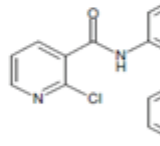
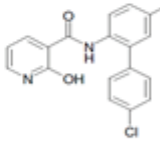
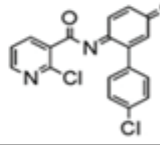
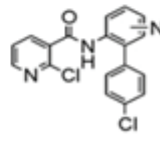
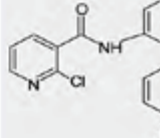
Nature	Molecular formula change	Mass shift (Da) (monoisotopic neutral mass)	Nominal neutral mass (Da)	Monoisotopic neutral mass (d'après Isotope patern Bruker)	Mass defect shift	
					Da	mDa
	+O ₃	+48	48	47,984744	-0,0153	-15,3
Conj. Acetyl	+C ₂ H ₂ O	+42	42	42,010565	0,0106	10,6
	+2OH	+34	34	34,005479	0,0055	5,5
	+O ₂	+32	32	31,989829	-0,0102	-10,2
Conj. Methyl	+OCH ₂	+30	30	30,010565	0,0106	10,6
	+O ₂ , -H ₂	+30	30	29,974179	-0,0258	-25,8
	+2O, -4H	+28	28	27,95853	-0,0415	-41,5
	-H, +CN	+25	25	24,995249	-0,0048	-4,8
	+H ₂ O	+18	18	18,010565	0,0106	10,6
	-CH ₂ , +O ₂	+17	17	16,966354	0,0336	33,6
	+O	+16	16	15,994915	-0,0051	-5,1
	+O ₂ , -CH ₄	+16	16	15,958529	-0,0415	-41,5
	+O ₂ , -NH ₃	+15	15	14,96328	-0,0367	-36,7
Conj. Methyl	+CH ₂	+14	14	14,01565	0,0157	15,7
	+O, -H ₂	+14	14	13,979265	-0,0207	-20,7
	+H ₄	+4	4	4,0313	0,0313	31,3
	+OH, -N	+3	3	2,999666	-0,0003	-0,3
	+H ₂	+2	2	2,01565	0,0156	15,6
	-C ₂ H ₆ , +O ₂	+2	2	1,942879	-0,0571	-57,1
	+O, -CH ₂	+2	2	1,979265	-0,0207	-20,7
	+H	+1	1	1,007825	0,0078	7,8
	+O, -NH	+1	1	0,984016	-0,0160	-16,0
	+O, -CH ₄	0	0	-0,036385	-0,0364	-36,4
	+O, -NH ₃	-1	-1	-1,031634	-0,0316	-31,6
Dehal. (F)	-F, +OH	-2	-2	-1,995663	0,0043	4,3
	-H ₂	-2	-2	-2,01565	-0,0156	-15,6
	-H ₄	-4	-4	-4,0313	-0,0313	-31,3
	+O, -C ₂ H ₄	-12	-12	-12,036385	-0,0364	-36,4
	-C ₃ H ₈ , +O ₂	-12	-12	-12,072771	-0,0728	-72,8
	+H ₂ , -O	-14	-14	-13,979265	0,0207	20,7
	-C ₂ H ₆ , +O	-14	-14	-14,052035	-0,0520	-52,0
	-CH ₂	-14	-14	-14,01565	-0,0157	-15,7
	-O	-16	-16	-15,994915	0,0051	5,1
	+O, -S	-16	-16	-15,977156	0,0228	22,8
	-H ₂ O	-18	-18	-18,010565	-0,0106	-10,6
Dehal. (F)	-F, +H	-18	-18	-17,990578	0,0094	9,4
Dehal. (Cl)	-Cl, +OH	-18	-18	-17,966113	0,0339	33,9
Dehal. (F)	-HF	-20	-20	-20,006228	-0,0062	-6,2
	-C ₃ H ₈ , +O	-26	-26	-26,052035	-0,0520	-52,0
	-CO	-28	-28	-27,994915	0,0051	5,1
	-C ₃ H ₈ , +O	-28	-28	-28,067685	-0,0677	-67,7
	-C ₂ H ₄	-28	-28	-28,0313	-0,0313	-31,3
	+H, -NO	-29	-29	-28,990164	0,0098	9,8
	+H ₂ , -O ₂	-30	-30	-29,974179	0,0258	25,8
	-CH ₂ O	-30	-30	-30,010565	-0,0106	-10,6
Dehal. (Cl)	-Cl, +H	-34	-34	-33,961028	0,0390	39,0
Dehal. (F)	-F ₂ , +H ₂	-36	-36	-35,981156	0,0188	18,8
Dehal. (Cl)	-HCl	-36	-36	-35,976678	0,0233	23,3
Dehal. (F)	-2HF	-40	-40	-40,012456	-0,0125	-12,5

Nature	Molecular formula change	Mass shift (Da) (monoisotopic neutral mass)	Nominal neutral mass (Da)	Monoisotopic neutral mass (d'après Isotope patern Bruker)	Mass defect shift	
					Da	mDa
	-C ₄ H ₈ +O	-40	-40	-40,067685	-0,0677	-67,7
	-C ₂ H ₆	-42	-42	-42,04695	-0,0470	-47,0
	-CO ₂	-44	-44	-43,989829	0,0102	10,2
	+H, -NO ₂	-45	-45	-44,985078	0,0149	14,9
Dehal. (F)	-F _y +H ₃	-54	-54	-53,971734	0,0283	28,3
	-C ₄ H ₈	-56	-56	-56,0626	-0,0626	-62,6
Dehal. (Br)	-Br, +OH	-62	-62	-61,915598	0,0844	84,4
Dehal. (Cl)	-Cl ₂ +H ₂	-68	-68	-67,922056	0,0779	77,9
Dehal. (F)	-CF _y +H	-68	-68	-67,987384	0,0126	12,6
Dehal. (Cl)	-2HCl	-72	-72	-71,953356	0,0466	46,6
Dehal. (Br)	-Br, +H	-78	-78	-77,910513	0,0895	89,5
Dehal. (Br)	-HBr	-80	-80	-79,926163	0,0738	73,8
	-C ₇ H ₆	-90	-90	-90,04695	-0,0469	-46,9
Dehal. (Br)	-Br ₂ +H ₂	-156	-156	-155,821026	0,1790	179,0
Dehal. (Br)	-2HBr	-160	-160	-159,852326	0,1477	147,7

Annexe 3. Métabolites connus des pesticides étudiés

METABOLITES DU BOSCALIDE D'après (152–155)

Formule brute	Nom	M (Compass Isotope Pattern)	LogP estimé (ChemSketch)		Structure
			Log P	+/-	
C5H4NCl	Laguna- Allué -10	1130032	1,40	0,21	
C7H5O2Cl	M510F64	1559978	2,65	0,23	
C6H4NO2Cl	M510F47	1569931	0,37	0,37	
C6H4NO3Cl	Laguna- Allué -8	1729880	-0,42	0,41	
C12H10NCl	M510F62	2030502	3,25	0,26	
C11H10O4	Laguna- Allué -11	2060579	1,40	0,37	
C13H10NOCl	M510F52	2310451	3,48	0,29	
C14H12NOCl	M510F53	2450607	2,59	0,49	
C18H13N2OCl	M510F08	3080716	4,06	0,38	

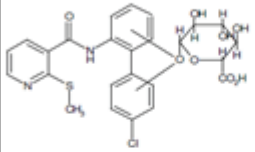
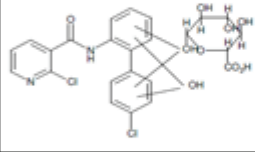
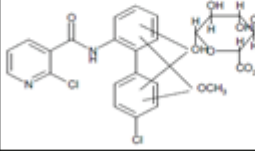
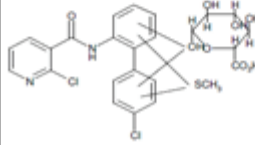
C18H13N2OCl	M519F09	3080716	3,74	0,40	
C18H11N2O2Cl	Lohmann -5	3220509	1,08	0,64	
C18H13N2O2Cl	Lohmann -4	3240666	2,96	0,41	
C18H13N2O2Cl	M510F49	3240666	4,07	0,47	
C18H13N2OSCl	M510F06	3400437	5,10	0,50	
C18H13N2O3Cl	M510F10	3400615	2,24	0,42	
C18H13N2O3Cl	M510F51	3400615	3,32	0,47	
C18H10N2O2Cl2	Lohmann -2	3560119	4,22	0,75	
C18H13N3OCl2	Lohmann -3	3570436	2,35	0,72	
C18H12N2O2Cl2	Laguna s- Alhué -1	3580276	3,55	0,42	

C18H12N2O2Cl2	Laguna s- Alués -2	358,0276	3,59	0,43	
C18H12N2O2Cl2	M510F01	358,0276	3,55	0,42	
C18H12N2O2Cl2	M510F50	358,0276	4,96	0,44	
C18H13N2O3Cl	M510F11	372,0335	3,57	0,52	
C18H13N2O3Cl	M510F13	372,0335	5,53	0,61	
C18H12N2O3Cl2	M510F59	374,0225	3,55	0,42	
C18H12N2O3Cl2	Laguna s- Alués -3	374,0225	4,17	0,44	
C18H12N2O3Cl2	Laguna s- Alués -4	374,0225	4,20	0,44	
C18H12N2O3Cl2	Laguna s- Alués -6	374,0225	2,94	0,44	
C18H12N2O3Cl2	Laguna s- Alués -7	374,0225	3,04	0,44	
C20H15N2O4Cl	M510F19	382,0720	/		

C20H15N0S0Cl		384,0639	/		
C19H15N2O3S0Cl	M510F12	386,0492	3,71	0,52	
C19H14N2O3Cl2	M510F16	388,0381	3,32	0,44	
C20H15N2O5Cl	M510F18	398,0669	3,89	0,48	
C19H15N2O4S0Cl	M510F63	402,0441	3,09	1,07	
C18H12N2O52Cl2	M510F15	405,9768	4,97	0,57	
C18H12N2O5Cl2	M510F14	406,0123	1,93	0,47	
C21H18N3O3S0Cl	M510F05	427,0757	4,40	1,05	
C18H12N2O5S0Cl2	M510F03	437,9844	3,42	0,67	
C21H18N3O4S0Cl	M510F23	443,0707	4,54	1,05	

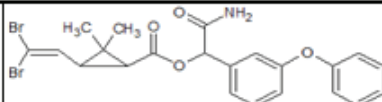
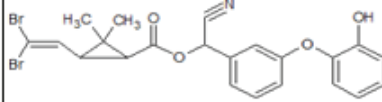
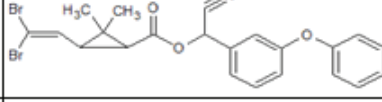
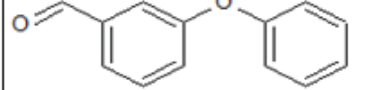
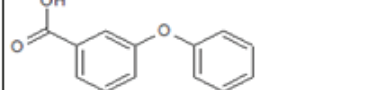
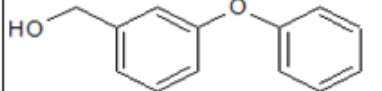
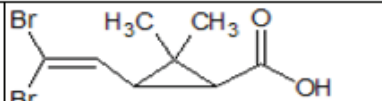
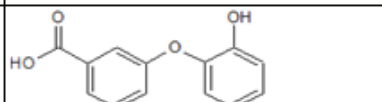
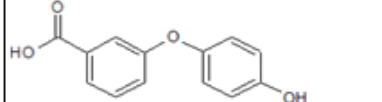
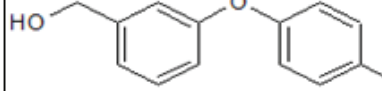
C21H18N3O5SCl	M510F22	459,0656	2,86	1,05	
C20H16N2O3S2Cl2	M510F20	465,9979	3,72	0,53	
C23H20N3O4SCl	M510F04	469,0863	4,02	1,05	
C21H17N3O4S2Cl	M510F58	477,0317	3,14	1,05	
C21H19N3O4S2Cl	M510F57	479,0473	2,83	0,81	
C24H21N2O8Cl	M510F29	500,0986	0,69	0,57	
C23H20N3O6S2Cl	M510F28	501,0761	2,58	1,05	
C24H21N2O7S2Cl	M510F48	516,0758	4,26	0,69	
C18H12N2O9S2Cl2	M510F54	533,9361	2,47	0,80	
C24H20N2O8Cl2	M510F02	534,0597	1,29	0,57	
C23H19N3O6S2Cl	M510F33	535,0372	2,04	1,08	

C28H28N5O7SCl	M510F43	613,1398	327	0,87	
C28H27N5O7SCl2	M510F45	647,1008	2,72	0,86	
C28H27N5O8SCl2	Lohmann -6	663,0957	2,11	0,86	
C28H26N4O7S2Cl2	M510F32	664,0620	2,89	1,23	
C28H29N5O8SCl2	M510F46	665,1114	1,53	0,94	
C36H23N4O2Cl4	Lohmann -7	683,0575			
C28H26N4O9S2Cl2	M510F34	696,0518	0,25	0,88	
C36H22N5O2Cl4	Lohmann -10	696,0528			
C36H21N4O3Cl4	Lohmann -9	697,0368			
C30H32N2O13Cl2	M510F61	698,1281	1,47	0,50	

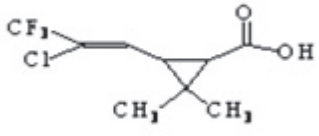
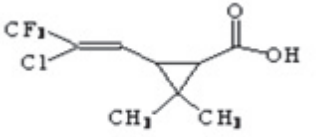
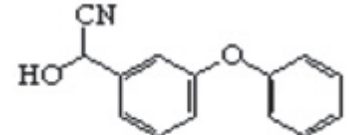
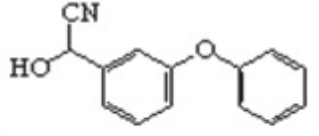
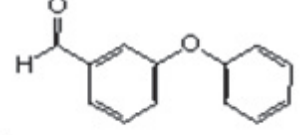
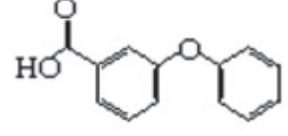
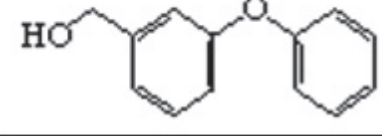
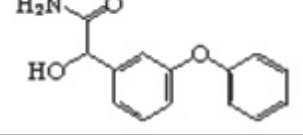
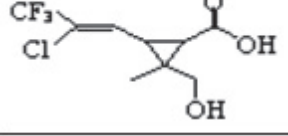
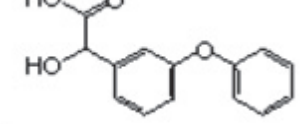
C36H23N4O3Cl4	Lohmann -8	699,0524			
C31H31N2O15SCl	M510F39	738,1134	-0,86	0,65	
C30H28N2O17Cl2	M510F40	758,0765	-2,23	0,78	
C32H32N2O17Cl2	M510F41	786,1078	-2,33	0,74	
C32H32N2O15S2Cl2	M510F42	818,0621	-0,73	0,73	

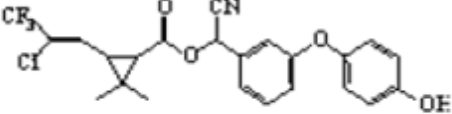
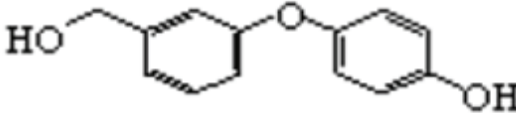
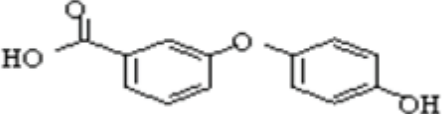
METABOLITES DE LA DELTAMETHRINE

D'après (159)

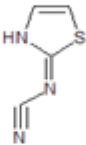
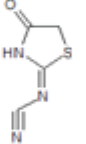
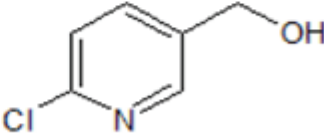
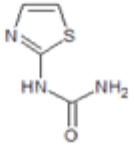
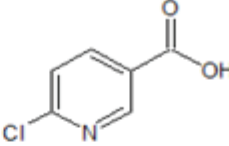
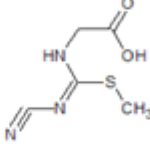
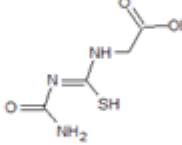
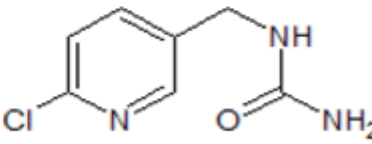
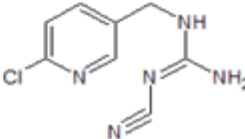
Formule brute	Nom		M (Compass Isotope Pattern)	LogP estimé (ChemSketch)		Structure
				Log P	+/-	
C22H21N104Br2	RU 38250	deltaméthrin amide	520,98319	5,73	0,67	
C22H19N104Br2	RU 51713	2-OH deltaméthrin	518,96754	5,25	0,68	
	RU 53605	4-OH deltaméthrin		5,34	0,71	
C13H1002	RU 26684	mPB aldehyde	198,06753	3,38	0,43	
C13H1003	RU 50293	mPB acid	214,06245	3,91	0,4	
C13H1202	RU 27330	mPB alcohol	200,08318	3,03	0,32	
C8H1002Br2	RU 23441	(cis) Br2CA	295,90421	2,86	0,4	
	RU 28302	(trans) Br2CA				
C13H1004	RU 50961	2'OH mPB acid	230,05736	2,96	0,41	
	RU 46606	4'OH mPB acid		3,05	0,48	
C13H1203	RU 46605	4'OH mPB alcohol	216,0781	2,17	0,41	

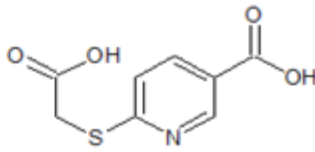
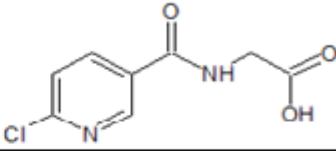
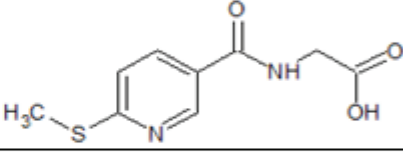
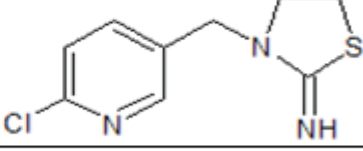
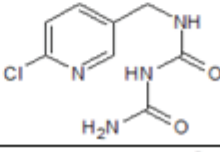
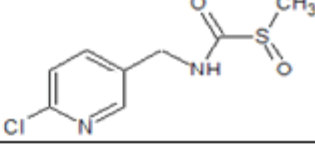
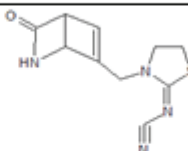
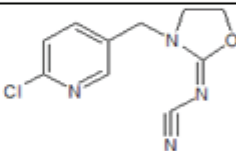
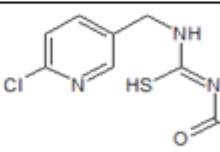
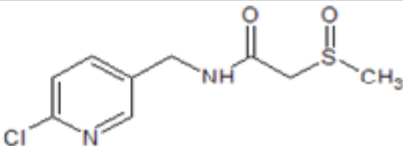
MÉTABOLITES DE LA LAMBDA-CYHALOTHRINE D'après (160)

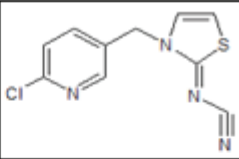
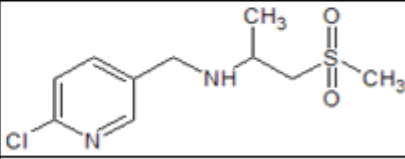
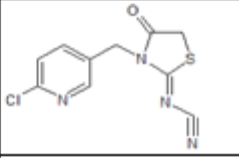
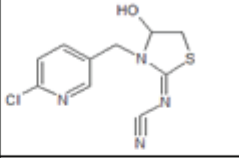
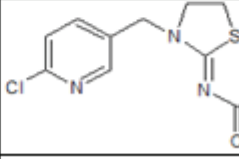
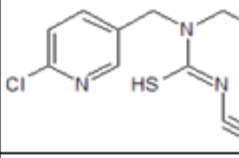
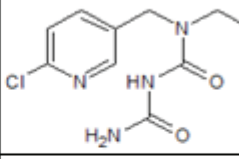
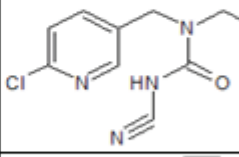
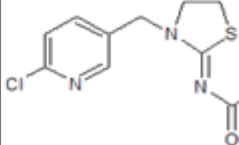
Formule brute	Nom	M (Compass Isotope Pattern)	LogP estimé (ChemSketch)		Structure
			Log P	+/-	
C ₉ H ₁₀ O ₂ ClF ₃	Ia	2420316	2,44	0,66	
C ₉ H ₁₀ O ₂ ClF ₃	Ib	2420316	2,44	0,66	
C ₁₄ H ₁₁ N ₀ O ₂	II	2250784	2,82	0,43	
C ₁₄ H ₁₁ N ₀ O ₂	III	2250784	2,82	0,43	
C ₁₃ H ₁₀ O ₂	IV	1980675	3,38	0,43	
C ₁₃ H ₁₀ O ₃	V	2140624	3,91	0,4	
C ₁₃ H ₁₂ O ₂	VI	2000832	3,03	0,32	
C ₁₄ H ₁₃ N ₀ O ₃	IX	2430890	1,82	0,45	
C ₈ H ₈ O ₃ ClF ₃	XI	2440114	0,57	0,67	
C ₁₄ H ₁₂ O ₄	XIII	2440730	2,91	0,42	

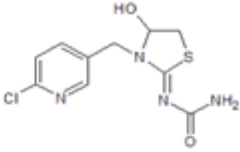
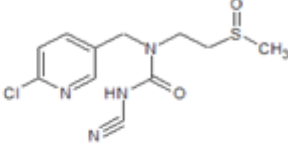
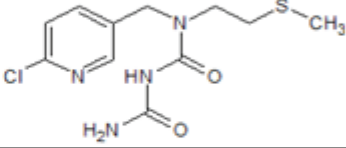
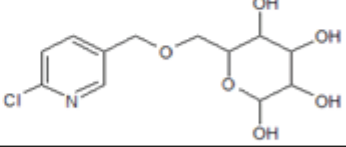
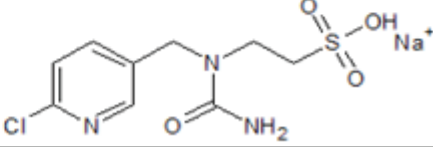
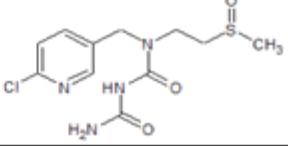
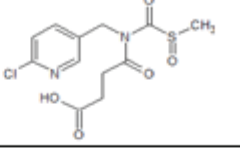
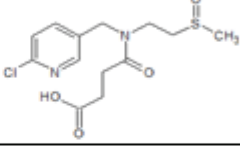
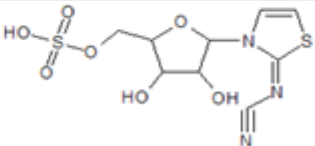
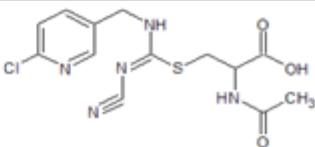
C ₂₃ H ₁₉ N ₀ F ₃ Cl	XV	465,0949	5,35	0,85	
C ₁₃ H ₁₂ O ₃	XIX	216,0781	2,17	0,41	
C ₁₃ H ₁₀ O ₄	XXIII	230,0574	3,05	0,48	

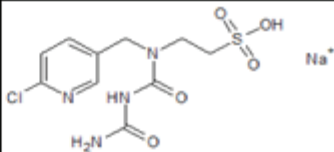
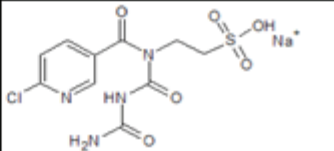
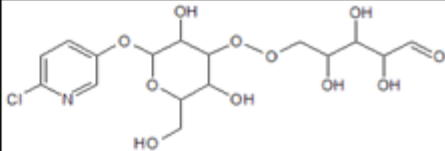
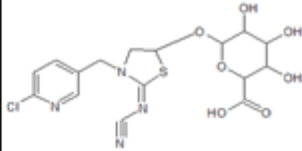
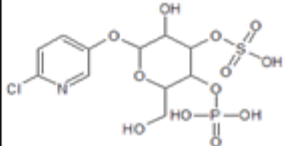
METABOLITES DU THIACTOPRIDE D'après (157,158)

Formule brute	Nom	M (Compass Isotope Pattern)	LogP estimé (ChemSketch)		Structure
			Log P	+/-	
C ₄ H ₃ N ₃ S	M21	125,0042	0,72	0,77	
C ₄ H ₃ N ₃ O ₂ S	M20	140,9991	-0,11	0,79	
C ₆ H ₆ NOCl	M36	143,0132	0,21	0,24	
C ₄ H ₅ N ₃ O ₂ S	M23	143,0148	-0,32	0,6	
C ₆ H ₄ N ₁ O ₂ Cl	M03	156,9925	0,98	0,36	
C ₅ H ₇ N ₃ O ₂ S	M19	173,0253	0,37	0,61	
C ₄ H ₇ N ₃ O ₃ S	M18	177,0208	-0,49	0,64	
C ₇ H ₈ N ₃ OCl	M31	185,0350	-0,09	0,4	
C ₈ H ₈ N ₅ Cl	M14	209,0463	0,19	0,24	

C8H7N1O4S	M06	213,0090	0,67	0,5	
C8H7N2O3Cl	M07	214,0140	0,29	0,56	
C9H10N2O3S	M09	226,0407	0,79	0,59	
C9H10N3SCl	M29	227,0278	-0,11	0,82	
C8H9N4O2Cl	M32	228,0409	-0,85	0,59	
C8H9N2O2SCl	M41	232,0068	-0,94	0,62	
C10H10N4OS		234,0570			/
C10H10N4OS	M35	234,0575	-1,77	0,82	
C10H9N4OCl	M16	236,0459	0,2	0,65	
C8H9N4OClS	M17	244,0186	0,83	0,63	
C9H11N2O2SCl	M24	246,0224	-1,29	0,52	

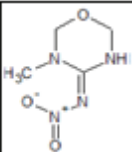
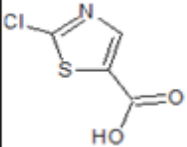
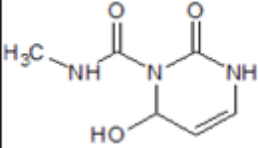
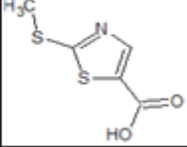
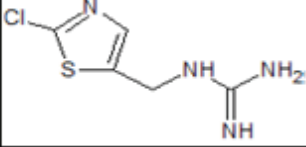
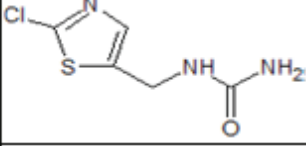
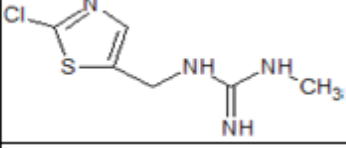
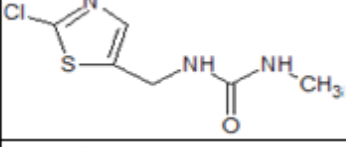
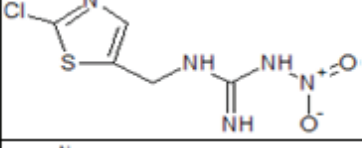
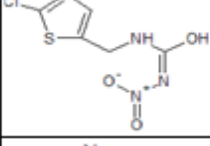
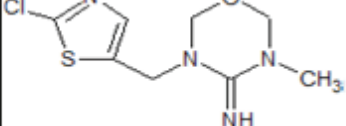
C10H7N4SCl	M38	250,0074	1,49	0,81	
C10H9N4ClS		252,0231			/
C9H11N2O3SCl	M28	262,0173	0,3	0,36	
C10H7N4OCl	M27	266,0024	0,66	0,83	
C10H9N4ClSO	M01	268,0180	-0,25	0,8	
C11H13N4O2Cl		268,0722			/
C10H11N4ClSO	M02	270,0337	-0,19	0,77	
C10H11N4OSCl	M26	270,0337	1,04	0,67	
C10H13N4O3Cl	M25	272,0671	-1,38	0,63	
C11H13N4OSCl	M42	284,0493	0,79	0,64	
C10H11N4O2ClS	M11	286,0286	0,02	0,79	

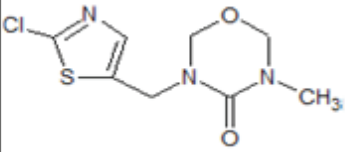
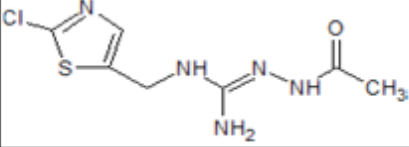
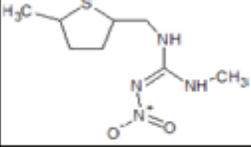
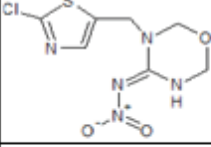
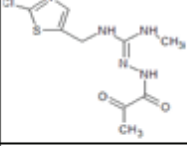
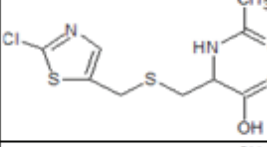
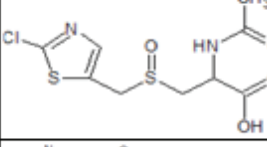
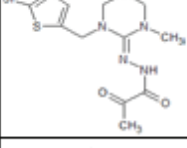
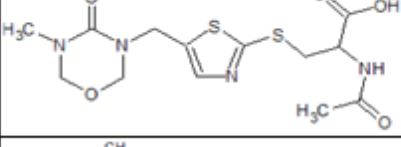
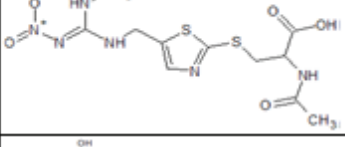
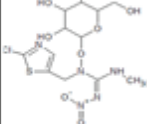
C10H11N4O2SCL	M37	286,0291	-0,98	0,79	
C11H13N4O2SCL	M08	300,0442	-1,23	0,65	
C11H15N4O2SCL	M43	302,0599	0,06	0,64	
C12H16ClNO6	M04	305,0666	0,68	0,53	
C9H11ClN3NaO4S	M34	315,0056	/	/	
C11H15N4O3SCL	M10	318,0548	-1,96	0,64	
C12H13N2O5SCL	M45	332,0228	-1,55	0,66	
C13H17N2O4SCL	M44	332,0592	0,04	0,54	
C10H13N4O5ClS		336,0290			/
C9H11N3O7S2	M22	337,0033	-0,48	1	
C13H14N5O3ClS	M15	355,0500	1,03	0,67	

<chem>C10H13ClN4NaO5S</chem>	M30	359,0193	/	/	
<chem>C10H10ClN4NaO6S</chem>	M33	371,9907	/	/	
<chem>C16H22ClNO11</chem>	M39	439,0881	0,5	0,78	
<chem>C16H17ClN4O7S</chem>	M12	444,0506	-2,31	0,91	
<chem>C11H15ClNO12PS</chem>	M40	450,9741	-1,11	0,68	

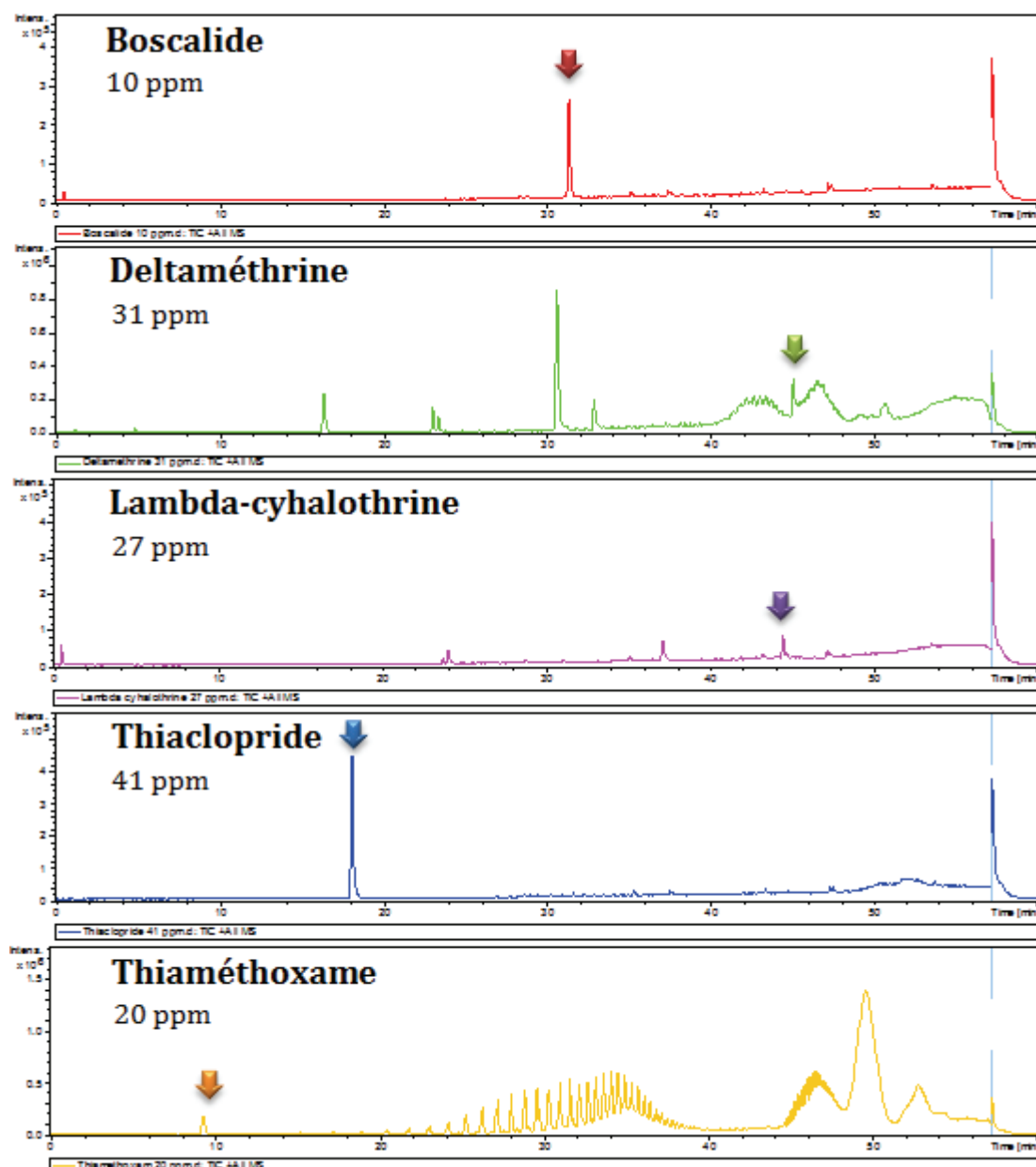
METABOLITES DU THIAMETHOXAME D'après (156)

Formule brute	Nom	M (Compass Isotope Pattern)	LogP estimé (ChemSketch)		Structure
			LogP	+/-	
C2H7N3	CGA 382191	73,0634	-1,49	0,28	
C2H6N2O	methylurea	74,0475	-1,23	0,24	
C3H9N3O	CGA 353042	103,0740	-2,55	-0,68	
C1H4N4O2	NOA 424255	104,0329	-0,89	0,19	
C2H5N4O2	NOA 405217	117,0407	-0,98	0,66	
C3H6N4O3	CGA 340575	146,0434	-1,67	0,27	
C4H5N2SCl	CGA 309335	147,9856	-0,14	0,44	
C4H4NOSCl	CGA 349208	148,9697	-0,19	0,44	
C6H9N3O2	Component K	155,0689	-1,5	0,64	

C5H8N4O2	CGA 282149	156,0642	-1,56	0,67	
C4H2N02SCl	CGA 359683	162,9489	0,67	0,83	
C6H9N3O3	Component D	171,0638	-2,44	0,65	
C5H5NO2S2	NOA 402988	174,9756	1,46	0,82	
C5H7N4SCl	NOA 421276	190,0074	-0,94	0,52	
C5H6N3OSCl	Metab 4U, 8U, 13U	190,9915	-0,5	0,56	
C6H9N4SCl	NOA 421275	204,0231	0,47	0,66	
C6H8N3OSCl	CGA 353968	205,0071	-0,47	0,53	
C5H6N5O2SCl	CGA 265307	234,9925	-0,43	0,75	
C5H5N4O3SCl	NOA 404617	235,9765	0,45	0,68	
C8H11N4OSCl	NOA 407475	246,0337	0,09	0,51	

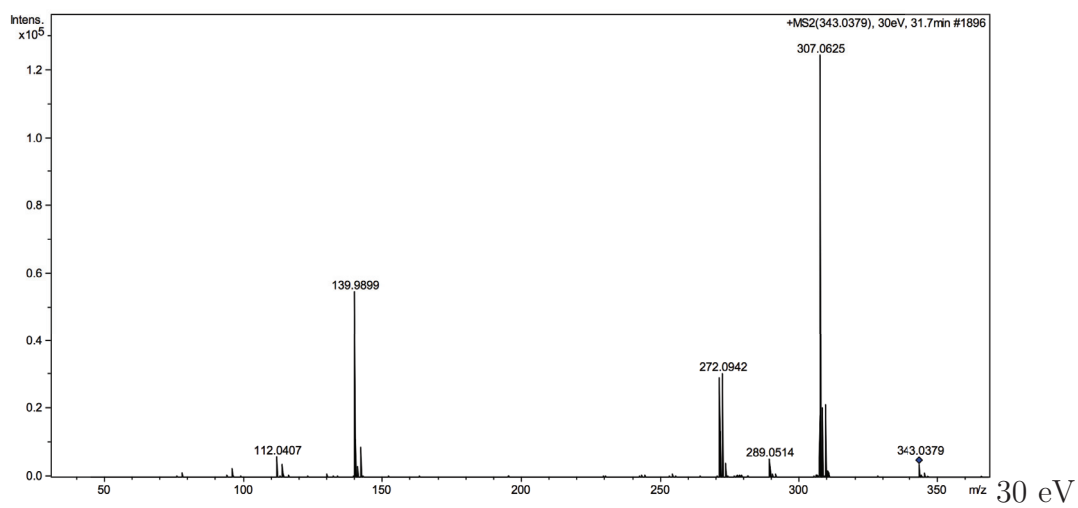
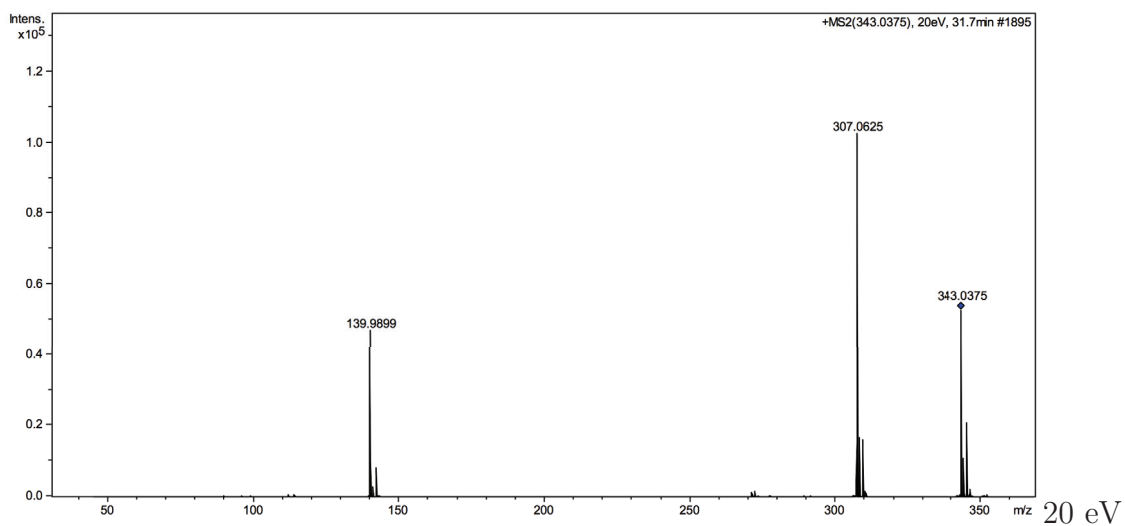
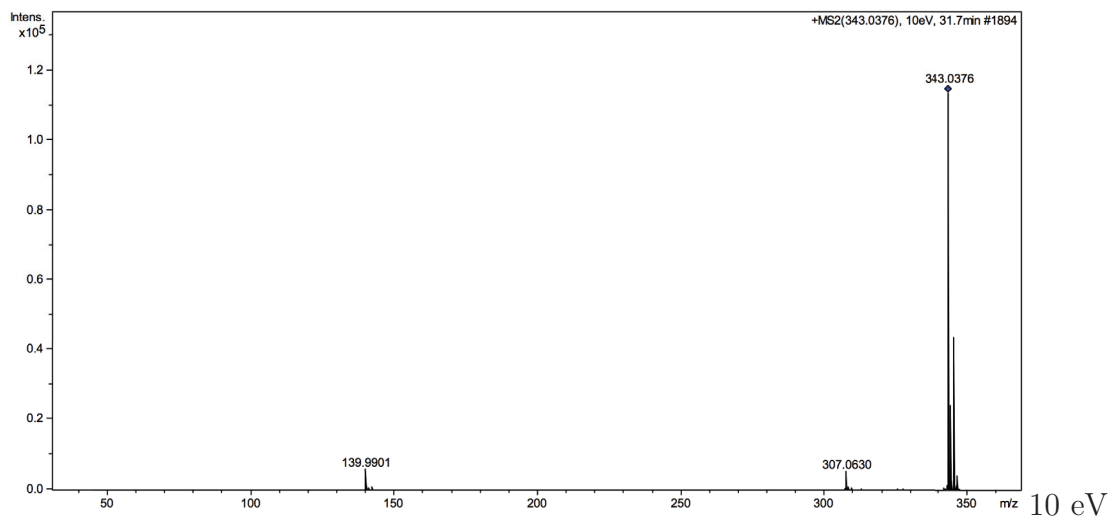
C8H10N3O2SCL	CGA 355190	247,0177	-0,13	0,51	
C7H10N5O3SCL	MU3	247,0289	-0,67	0,65	
C6H8N5O2SCL	CGA 322704	249,0082	0,74	0,44	
C7H8N5O3SCL	CGA 330050	277,0031	-0,92	0,75	
C9H12N5O2SCL	MU12	289,0395	-0,72	0,68	
C9H11N2O3S2Cl	Metab 6U	293,9894	0,07	0,77	
C9H11N2O4S2Cl	Metab 5U	309,9843	-1,55	0,73	
C11H14N5O3SCL	Metab L14	331,0500	-2,27	0,78	
C13H18N4O5S2	Metab 17U	374,0713	-0,01	0,68	
C11H16N6O5S2	Metab 16	376,0618	-0,01	0,66	
C12H18ClN5O8S	CGA 322704-NO-glucoside	427,0565	0,26	0,79	

Annexe 4. Analyse des solutions de pulvérisation : EIC des pesticides étudiés

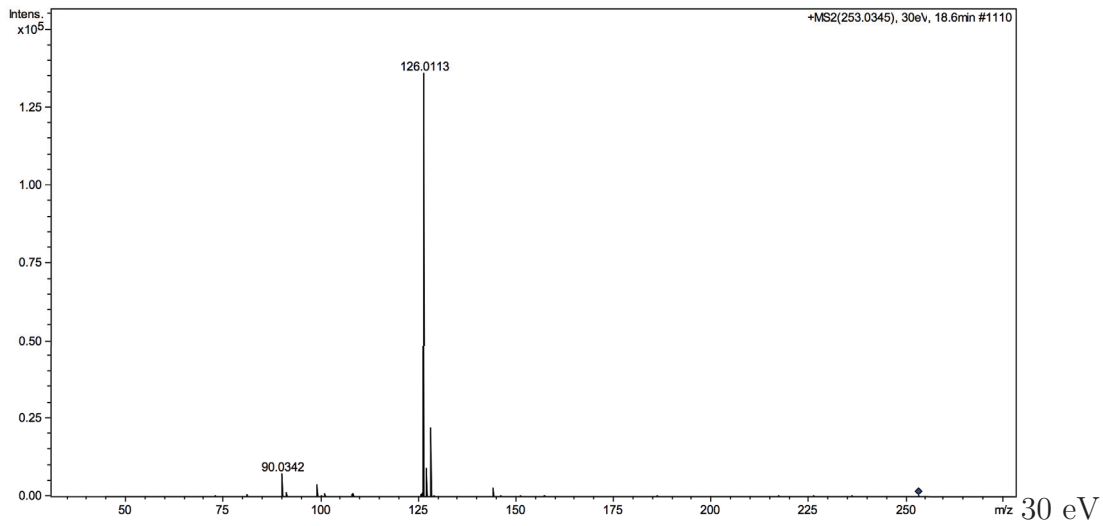
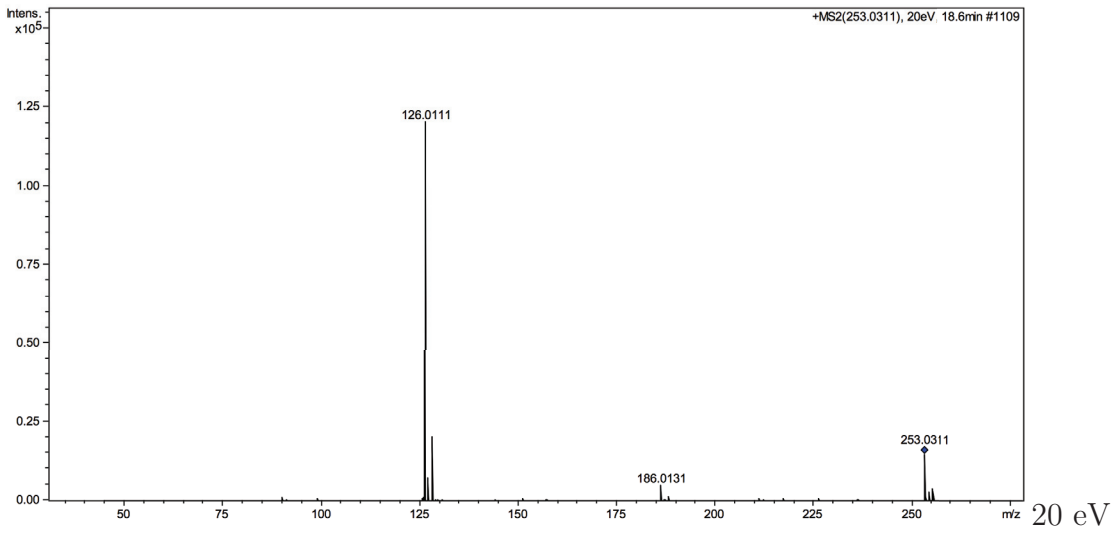
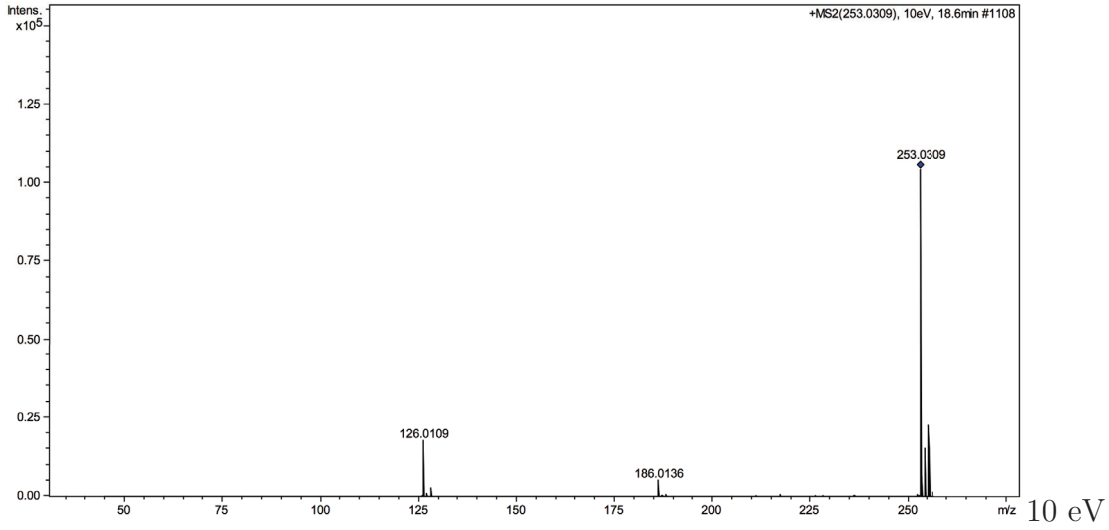


Annexe 5. Spectres de fragmentation (10, 20 et 30 eV) des molécules mères étudiées pour la métabolisation : boscalide, thiaclopride, thiaméthoxame, deltaméthrine et lambda-cyhalothrine

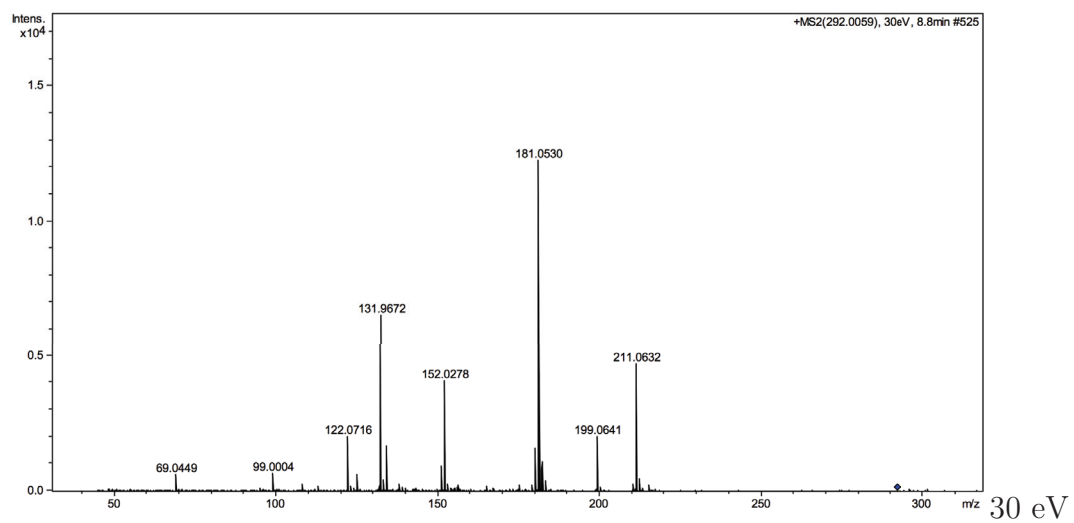
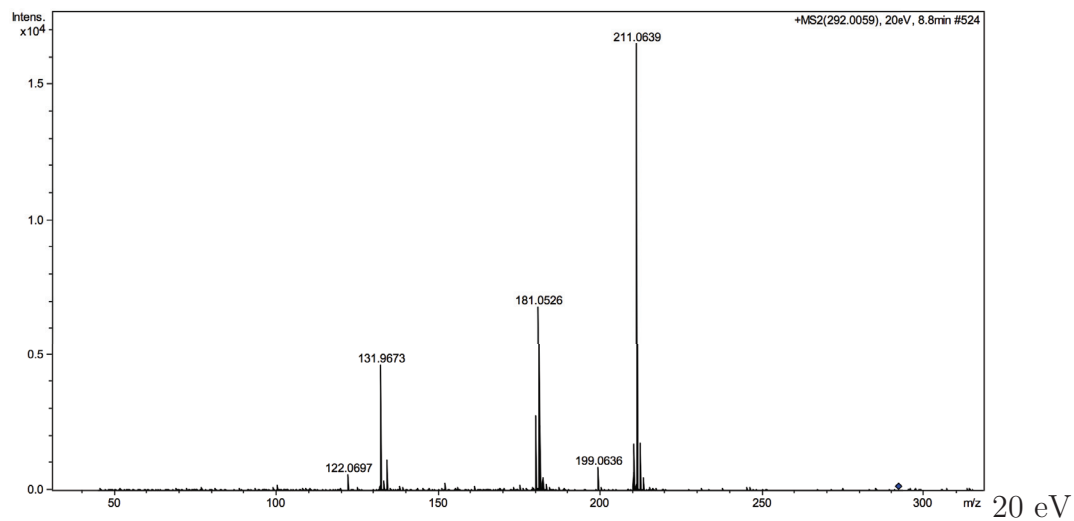
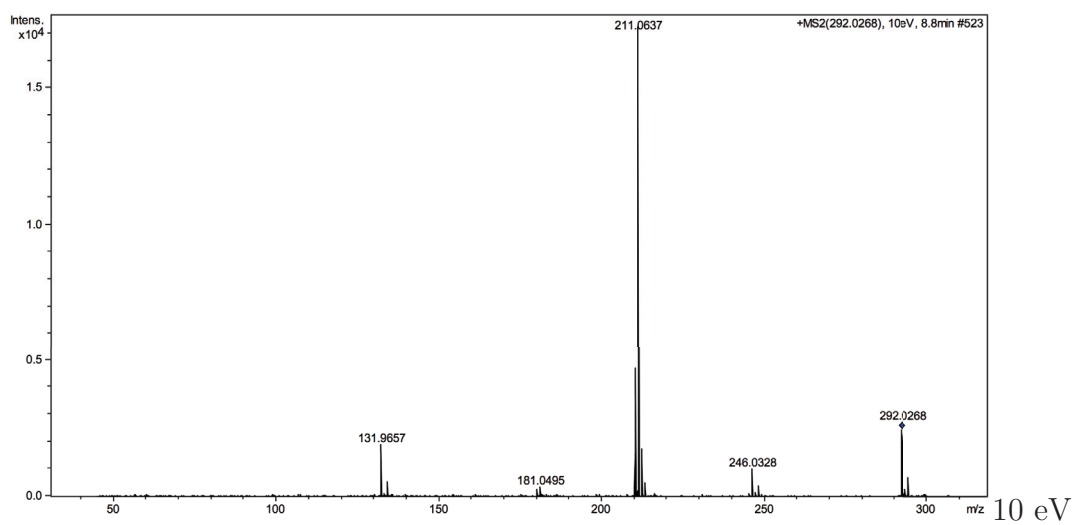
BOSCALIDE



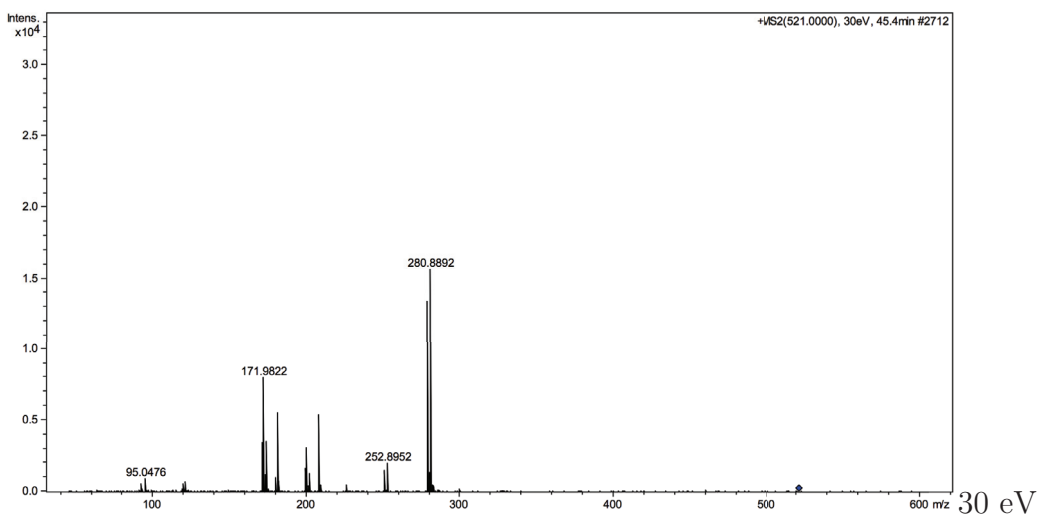
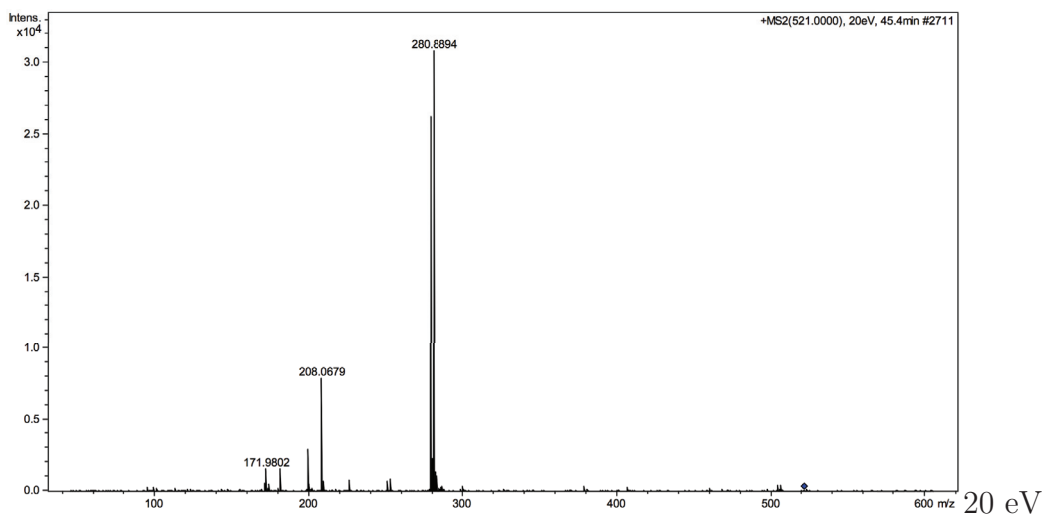
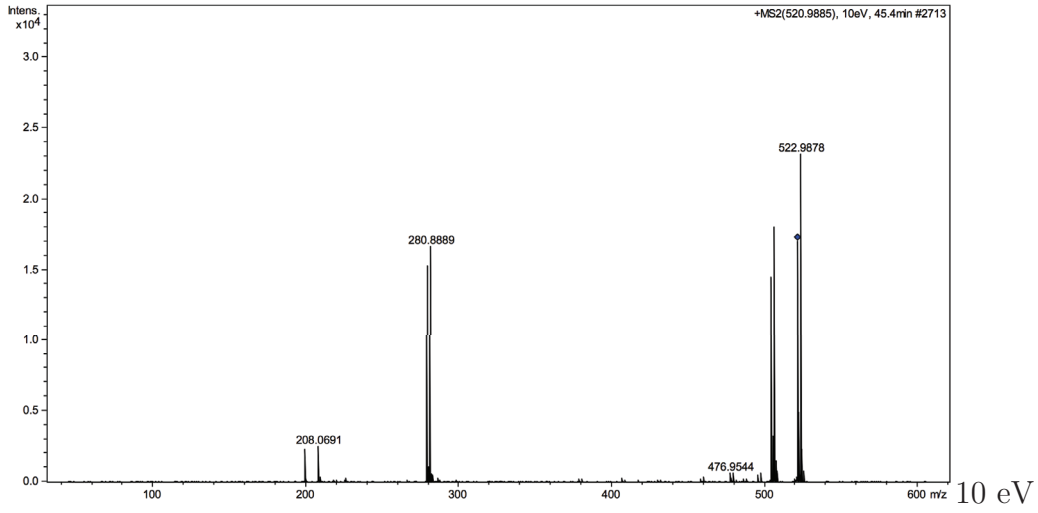
THIACLOPRIDE



THIAMÉTHOXAME



DELTAMÉTHRINE



LAMBDA-CYHALOTHRINE

