



HAL
open science

Etude du transport de molécules bioactives dans l'épiderme de fruits à pépins(Rosacea Juss) : mise au point et développement d'un procédé d'extraction de produits phytosanitaires

Géraldine Giacinti

► **To cite this version:**

Géraldine Giacinti. Etude du transport de molécules bioactives dans l'épiderme de fruits à pépins(Rosacea Juss) : mise au point et développement d'un procédé d'extraction de produits phytosanitaires. Autre. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT, 2016. Français. NNT : 2016INPT0085 . tel-04258402

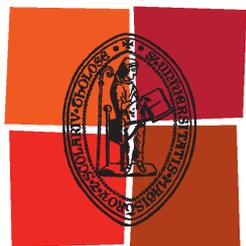
HAL Id: tel-04258402

<https://theses.hal.science/tel-04258402v1>

Submitted on 25 Oct 2023

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.



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Sciences des Agroressources

Présentée et soutenue par :

Mme GERALDINE GIACINTI

le jeudi 20 octobre 2016

Titre :

ETUDE DU TRANSPORT DE MOLECULES BIOACTIVES DANS
L'EPIDERME DE FRUITS A PEPINS (ROSACEAE JUSS.). MISE AU
POINT ET DEVELOPPEMENT D'UN PROCEDE D'EXTRACTION DE
PRODUITS PHYTOSANITAIRES

Ecole doctorale :

Sciences de la Matière (SDM)

Unité de recherche :

Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle (L.C.A.)

Directeur(s) de Thèse :

MME VALERIE SIMON

MME CHRISTINE RAYNAUD

Rapporteurs :

M. FERNANDO LEAL-CALDERON, ENSCBP BORDEAUX

M. MAREK BIZIUK, UNIVERSITE TECHNIQUE DE GDANSK

Membre(s) du jury :

M. FERNANDO LEAL-CALDERON, ENSCBP BORDEAUX, Président

M. MANUEL MARCOUX, INP TOULOUSE, Membre

Mme VALERIE SIMON, INP TOULOUSE, Membre

RÉSUMÉ

L'agriculture moderne utilise depuis plus de cinquante ans de nombreux produits phytosanitaires de traitement dans le but d'assurer les meilleurs rendements et de limiter les pathogènes néfastes pour la santé humaine ou animale. Jusqu'à peu, la quantité de résidus phytosanitaires présents dans les denrées alimentaires (fruits, légumes, céréales, plantes fourragères, produits transformés...) était certes contrôlée mais en règle générale, ne soulevait que très peu d'interrogation en terme de conséquences à plus ou moins long terme. A l'heure actuelle, des exigences de plus en plus drastiques apparaissent et se généralisent. Les produits issus des industries agricole et agroalimentaire doivent répondre à des normes de plus en plus strictes en terme de résidus pour rester compétitives. En particulier, dans le cas des pommes, dont le nombre de traitements par saison est l'un des plus élevé en France, les exigences tendent vers le zéro résidu détectable.

La stratégie de cette étude repose, dans un premier temps, sur la compréhension des phénomènes de transfert à la surface du fruit. Une caractérisation physico-chimique de l'épiderme de différentes variétés de pommes a conduit à l'identification des structures impliquées dans l'interaction molécule bioactive-matrice biopolymérique. Le fludioxonil a été choisi comme molécule modèle en raison de sa fréquence d'utilisation comme fongicide de conservation et de sa composition atomique (présence de fluors). Les épidermes de pommes Fuji ont servi de matrice modèle.

Dans un second temps, un procédé de traitement par voie chimique des pommes a été mis au point et développé pour extraire les résidus de 12 molécules de phytosanitaires parmi les plus couramment utilisées dans les vergers de pommiers du Midi-Pyrénées. Trois variétés de pommes populaires en France ont été sélectionnées pour leurs différentes périodes de récolte correspondant à des risques de contamination variables. Les résultats ont conduit à la proposition d'un schéma de désorption des molécules bioactives dans la matrice biopolymérique, basé sur les théories de la solubilité de Hildebrandt et de Hansen.

En complément, le développement d'une méthode analytique de quantification par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse trappe d'ions (GC/MS²) des molécules phytosanitaires dans la matrice épidermique des pommes a mis en évidence que : 1- l'augmentation de la concentration des analytes d'intérêt au-dessus des limites de détection de la technique analytique appliquée favorisait la quantification des très faibles traces, voire des ultratracés ; 2- les analytes d'intérêt subissaient en parallèle des effets matrice négatifs. Une forte interaction entre certains analytes de la matrice et les phytosanitaires a été démontrée et une méthode de purification basée sur un couplage chromatographie sur couche mince haute performance avec la GC/MS² (CCMHP/GC/MS²) a été proposée afin de minimiser les effets matrice négatifs dans ce type d'extraits concentrés...

ABSTRACT

For more than fifty years, the modern agriculture uses lots of products for crop protection in order to ensure optimum yields and to limit pathogens harmful for human or animal health. Until recently, the levels of pesticides in foodstuffs (fruits, vegetables, cereals, forage crops, processed food...) were controlled but usually not problematic regarding the effects over time. Nowadays, more and more drastic requirements are appearing and becoming widespread. The products from farming and food industries must satisfy stricter and stricter standards in terms of residues for maintaining competitiveness. Particularly, for apples, whose treatments per season are among the highest in France, requirements tend to the zero detectable residue.

The strategy of this work deals with, on one hand, the understanding of the transfert stages involved at the outer surface of the fruit. A physico-chemical characterizations of epiderms of different apples led to the identification of the structures involved in the relationship between bioactive molecule and biopolymeric matrix. Fludioxonil was chosen for modelization for its frequency of use and for its atomic composition (fluorine). The epiderms of Fuji apples were selected as the matrix-model.

On the other hand, a chemically treatment process of apples was studied and developed to release the residues of 12 pesticides among the most currently used in apple orchards of Midi-Pyrenees. Three varieties of apples among the most popular in France were selected for their different periods of harvest corresponding to variable pests risks. The results led to a possible scheme of desorption of bioactive molecules in the biopolymeric matrix, based on the theory of solubility developed by Hildebrandt and Hansen.

In addition, the development of an analytical method of quantitation of pesticides in the epidermal matrix of apples by gas chromatography coupled with mass spectrometry ion trap (GC/MS²) highlighted that : 1- the increase of the concentrations of the analytes of interest over the limits of detection of the applied analytical method promoted the quantitation of very low traces, even ultratracés ; 2- the analytes of interest concurrently underwent negative matrix effects. A strong interaction between some matrix analytes with pesticides was demonstrated and a method of clean-up based on the hyphenation of high performance thin layer chromatography with GC/MS² (HPTLC/GC/MS²) was suggested to minimize the negative matrix effects in that kind of concentrated matrix extracts.

« La vie n'est facile pour aucun de nous. Mais quoi, il faut avoir de la persévérance, et surtout de la confiance en soi. Il faut croire que l'on est doué pour quelque chose, et que cette chose il faut l'atteindre coûte que coûte. »

Marie Curie



Remerciements

En 1786, l'Abbé Roubaud a écrit que « le savoir est la connaissance acquise par l'étude et par l'expérience ». Je trouve que cette pensée résume parfaitement ce que représente le travail d'une thèse de doctorat.

Mais ce savoir n'existerait pas s'il n'y avait toutes ces personnes qui contribuent de près et de loin à l'acquisition des données, du savoir-faire aussi et à leur mise en forme.

J'aimerais dédier ce travail à Christine Raynaud, car il faut bien l'avouer, sans elle, rien de tout cela ne serait arrivé. J'espère que j'ai été à la hauteur de son enseignement et de ses attentes durant ces 18 dernières années, qui représentent aujourd'hui un peu moins de la moitié de ma carrière professionnelle. Christine m'a appris mon métier, avec toute sa rigueur et son exigence. J'étais assez fière lorsqu'elle m'a proposé il y a quatre ans ce travail de thèse. Je la remercie donc pour tout cela. Et je me projette dès à présent, avec réjouissance, vers toutes les années à venir que nous allons continuer à partager professionnellement.

Je remercie sincèrement Valérie Simon qui a relevé le défi de codiriger cette thèse avec Christine. Ma carrière professionnelle s'est presque exclusivement articulée autour des entreprises, pour lesquelles les attentes ne sont pas purement académiques... Je remercie donc Valérie pour ce qu'elle a apporté durant cette thèse, de rigueur et de méthodologie. Justement plus académiques. J'ai rédigé mes premières publications et elle m'a montré la voie. J'ai apprécié chacune de ses remarques sur l'exploitation des données analytiques, la rédaction du manuscrit, la préparation de l'oral... J'ai beaucoup appris à ses côtés et je lui en suis reconnaissante. J'espère avoir été, malgré mes défauts, une bonne « étudiante » de thèse.

J'exprime mes sincères remerciements aux Professeurs Marek Biziuk et Fernando Leal-Calderon pour avoir accepté avec beaucoup de bienveillance et un grand professionnalisme d'être les rapporteurs de ces travaux de thèse. D'expérience, je sais qu'ils sont les piliers de la soutenance. En particulier, je suis reconnaissante au Professeur Biziuk pour son expertise en Français ! Je remercie Monsieur le Professeur Leal-Calderon pour avoir revêtu de surcroît, le jour de la soutenance, le costume de Président du Jury. J'ai été très honorée de leur présence dans ce jury.

Je remercie Manuel Marcoux, Maître de Conférence à l'Institut Mécanique des Fluides de Toulouse, que j'ai rencontré à l'occasion des séminaires scientifiques organisés par le LCA. Il était venu présenter entre autre la tomographie RX et il a dit quelque chose comme « ceux qui souhaitent venir faire des analyses de tomographie sont les bienvenus ». Bingo, mes pommes en avaient besoin ! On avait des ambitions mais il nous manquait du temps et puis la cuticule des pommes nous a donné du fil à retordre. J'espère que l'avenir nous donnera l'occasion de mettre en œuvre ce travail tant rêvé. Je remercie encore Manuel, pour son enthousiasme et sa disponibilité. Et aussi d'avoir accepté d'être rapporteur dans ce jury de thèse.

Je remercie Yannick Coppel, responsable du service commun de RMN du Laboratoire de Chimie de Coordination (Institut de Chimie de Toulouse) pour son immense savoir en RMN du solide. Je suis très fière de cette collaboration que nous avons pu

mettre en place à l'occasion de ces travaux de thèse. Un certain nombre d'hypothèses et d'interprétations n'ont pu être émises qu'à partir des résultats que nous avons obtenus en RMN ! Je le remercie encore pour son dévouement à ces manip et d'avoir accepté avec bienveillance d'être membre du jury de cette thèse. Nous avons encore du travail. Je n'oublie pas Pierre Lavedan et Marc Vedrenne, du Service Commun de RMN de l'UPS que j'embête régulièrement pour mes manip et qui ont eu la clairvoyance de m'orienter sur la RMN du solide.

Je remercie les spécialistes de la Lipochimie, au LCA, en les personnes de Zéphirin Mouloungui et Muriel Cerny. Nous nous sommes plongés ensemble dans la complexité des cires cuticulaires. Zeph était convaincu de ma réussite : dès le début, il m'a appelée Docteur alors que moi-même je n'étais pas sûre de signer pour l'année suivante. Je le remercie d'avoir cru en moi avec autant de conviction, et suis très fière qu'il ait accepté de participer à ces travaux et d'être membre du jury de cette thèse.

Ces travaux de thèse se sont déroulés dans le cadre du FUI Inno'Pom, un consortium de laboratoires et d'industriels, mené d'une main de maître par Julio Vallès. Il me tient à cœur de remercier toutes ces personnes avec lesquelles j'ai partagé ces quatre années d'étude. C'était un groupe dynamique, convivial et uni. Une grande expérience qui m'a préparée au grand oral qu'est la soutenance de thèse !

En particulier, je remercie Séverine Maldès, responsable Qualité chez Blue Whale, pour sa bienveillance, sa disponibilité, sa gentillesse, ses livraisons de pommes à chaque saison et son dévouement sans faille à la pomme.

Je remercie Bernard Dueso de MAF Roda pour son écoute et l'intérêt qu'il a porté à chacune de nos requêtes. Je remercie également René Puech, pour un ensemble de choses : les fabrications et livraison à domicile de pilotes, les bains d'huile et d'eau glacée, les immersions en chambre froide, les comptages de pommes, les manutentions multiples dignes des concours de Force Basque, les manip pilote, les goûters de pomme et de thé du distributeur de Quercy Soleil, les déjeuners à Moissac, les heures non stop, les coups de fil pour les nouvelles années, les veilles de vacances, le soutien lors de la rédaction et de la soutenance... Bref merci pour tout, les galères comme les bons moments.

Par la même occasion, je souhaiterais remercier vivement tout le personnel de la station fruitière de Quercy Soleil pour leur accueil sur site à l'occasion des manip pilote : son Directeur Christophe Tillet, Fabienne et Vincent, les responsables qualité et production, ainsi que Philippe et Thierry.

Sans laboratoire, il n'y aurait pas de thèses, donc je voudrais bien sûr remercier nos Directeurs, Carlos Vaca-Garcia et Gérard Vilarem pour leur soutien. J'ai commencé ma carrière au CATAR, il y a 18 ans, sous la direction de Monsieur Vilarem, qui a toujours fait preuve d'une grande bienveillance à mon égard. Il a été aussi un de mes plus grands soutiens lors de ces quatre dernières années. Je le remercie pour tout.

Je ne peux absolument pas oublier Monsieur le Professeur Antoine Gaset ! C'est juste incroyable l'énergie qu'il a su me transmettre à chacun de ses passages au laboratoire et son soutien à quelques jours de la soutenance ! Je pense que nous, thésards du LCA, sommes tous ses enfants spirituels. Il doit se sentir l'âme d'un mentor pour tous ceux qui ont été formés

par ses soins et ceux qui aujourd'hui encore sont nourris par les efforts d'une vie, dédiée à la construction pierre après pierre de ce laboratoire. Je remercie Monsieur Gaset sincèrement.

C'est un laboratoire somme toute assez grand mais il y a toujours des personnes plus chères, sans qui ce travail n'aurait pas abouti tel qu'il est à ce jour. Je ne sais pas trouver les mots qui pourraient exprimer à leur juste valeur ma gratitude et mon amitié à Anne Lung. Elle a fait que les travaux ont commencé, s'est mise à la paillasse et s'est donnée à fond, comme à chaque fois. Elle est la personne la plus rigoureuse qui soit ici et depuis 18 ans que nous nous connaissons, je ne peux qu'admirer son expérience, sa rigueur et son habileté. Elle est un véritable exemple pour nous tous.

Avec Brigitte Dubreuil, nous avons partagé tellement de choses ensemble, les bons, les mauvais moments dans une carrière, dans une vie, les cours de dessin, les anniversaires, les nouvelles années... Les choses de la vie courante, en somme. Mais comment la remercier pour toutes nos discussions scientifiques, ses coups de pouce quand les résultats me démoralisaient, quand la rédaction se faisait plus lourde et difficile, pour ses idées, la biblio, et son écoute toujours attentive ! Et puis, je dois l'écrire ici, sa qualité exceptionnelle de « MacGyver », réparations en tous genres, idées brico, dépannage...

Je les remercie, toutes deux, Anne et Brigitte, pour leur amitié tout au long de ces années et leur soutien particulièrement actif ces quatre dernières années.

Je remercie Ingrid Pelletier pour son soutien et son amitié. Je me rappelle de son arrivée au laboratoire. Nous avons beaucoup travaillé ensemble à l'époque. J'en garde de supers souvenirs. Je regrette qu'elle n'ait pas pu participer plus à ce travail qui me tenait à cœur mais on ne choisit pas toujours où le vent nous mène... En tout cas, j'ai toujours pu compter sur elle, merci à ma Lulu !

Je me souviens exactement mon premier jour au LCA, en Septembre 1998. Didier Nicolas a été la première personne que j'ai croisée en haut des escaliers, près du secrétariat. Nous avons travaillé souvent ensemble, lui à la GC/MS HP5973 et moi à la GC/O Girdel. Les hydrodistillations, les sniffings de burlats confites, de foie gras, de truffes... Il y en a eu ! Quand j'y réfléchis, je me rends compte que nous avons toujours été et sommes encore voisins de paillasse ! Bien sûr, il m'a beaucoup soutenue au cours de cette thèse, moralement et physiquement pour les manipulations pilotes. Je le remercie pour tout !

S'il y a une personne qui m'a donné la force d'y croire, c'est bien Laure Candy. Sans ses mots d'encouragement, son oreille attentive, les répétitions, les corrections, je n'aurais même pas fait la moitié. Son expérience et son grand professionnalisme ont été pour moi une vraie inspiration. Je la remercie sincèrement pour tout ce qu'elle est et ce qu'elle apporte aux autres et par conséquent à moi.

Deux nouvelles arrivées ont insufflé un vent nouveau au LCA et au CATAR : Sophie Capblancq et Dominique Laporte. Deux anciennes de feu le LARA. Sophie, la pro des pesticides et de la GC/MS trappe d'ions et Dominique, la pro des caractérisations en tous genres, des calculs, des intervalles d'Horowitz ! Nous nous connaissons depuis quatre ans, c'est peu mais à la fois ça a été et c'est toujours très intense. Je remercie Sophie pour son aide et sa grande expertise : c'est une passionnée ! Des pesticides, entre autres ; de la masse, aussi. Elle a été l'inspiration pour une bonne partie de ce travail, pour les deux publications

également. Je remercie Dominique pour son aide, ses conseils avisés, son oreille toujours attentive à tout, les textos de bon matin ou le soir, les formules de calculs et les prises de tête ! je suis sûre d'avoir oublié des choses... J'espère qu'elle pardonnera. Je leur suis extrêmement reconnaissante à toutes les deux, Sophie et Dominique. J'espère que ces travaux et ce manuscrit rendront hommage à tout ce qu'elles ont apporté à cet édifice parfois précaire, en équilibre et parfois si robuste qu'on pensait tout révolutionner !

Ce travail est par conséquent aussi le leur, Anne, Brigitte, Didier, Sophie, Dominique, Laure.

Céline Mathieu a été un véritable sponsor de la pomme : citations, billets humoristiques... Rien ne lui a échappé ! Je la remercie donc pour ces bons moments et pour son soutien moral, qui a été sans faille durant quatre ans.

Je remercie Eric Lacroux et Jérôme Peydecastaing, pour leur soutien quotidien, les dépannages Mac, les impressions recto-verso... Bref, tout, absolument tout ce qui rend fou dans les moments de crise, les deadlines, l'envoi des manuscrits, les minutes précédant les réunions... Et avec beaucoup de zénitude et de classe ! Ou pas, d'ailleurs...

Je remercie Marion Alignan, pour son expertise en biologie végétale. Je lui dois, à elle et, sur ses conseils avisés, au Professeur Isabelle Fourasté, une de mes meilleures illustrations dans ce manuscrit.

Je remercie également Marie-Christine Talou, Karine Trémauville, Isabelle Noël, Mireille Juan et Isabelle Bauviès, toutes ces personnes qui font en sorte que les aspects financiers, administratifs se passent tellement bien. A leurs côtés, je ne peux dissocier Didier Dangla, Emmanuelle Dao et Romain Armengau qui ont la lourde tâche de la logistique. Toutes ces personnes essentielles sont les poumons de notre travail, à la paillasse. Sans eux, rien ne peut avoir lieu. Merci sincèrement.

Je remercie Bruno Payré et Dominique Goudounèche du Centre de Microscopie Electronique Appliquée à la Biologie de la plateforme Genotoul, qui partagent avec beaucoup de générosité la passion de leur métier.

Je tiens à remercier de tout mon cœur mon amie Marie Morard. Je ne peux exprimer ici tout ce que nous avons partagé, le labo, les fous rires, les peines, les doutes, les colères, les vacances, les galettes jambon-œuf-fromage du Flunch... Je ne trouve aucun mot assez fort pour exprimer ce qui nous unit. Elle m'a toujours soutenue, épaulée, tirée vers le haut. Elle n'est pas une amie, mais une sœur. J'espère qu'elle est fière de ce que j'ai pu accomplir.

Quiero agradecer a mis amigos argentinos que viven en Toulouse, los mas antiguos y los mas nuevos, pues con ellos comparto ese "cacho" tan importante de mi vida como es el tango. Lale, María Belen y Gonzalo, Yolanda, Monica, y mi amiga Felisa que vive en Buenos Aires, pero está cerca en mi corazón. Todos me han acompañado en el camino de estos años, cada uno a su manera, y con su amor y valiosa amistad. Los quiero muchísimo. Lale, es mas que una amiga, junto con el querido Pierre, nos divertimos juntas, "trabajamos" en la Maquina Tanguera, viajamos, charlamos.y por eso gracias por las cosas ricas que prepararon para mi "fiesta de graduación" Fue maravilloso y riquísimo! Mi profe y amiga María Belén (y su marido Gonzalo) de quien aprendo no solo el Tango Argentino, sino que me enseñó a tener más confianza en mí misma. A Yolanda y Mónica que están hace menos tiempo en mi vida, quiero que sepan que las descubrí y me encanta compartir comidas, charlas,

y baile con ellas. Y Feli de Buenos Aires, una persona que me escucha siempre, me entiende, y como una madre o hermana me cocina acá o allá berenjenas en escabeche, y milanesas que adoro y que cuando estoy en Buenos Aires me lleva a las milongas y toma helado de dulce de leche y compra medialunas para traer en la valija a Toulouse! La manera argentina de ser amigas, es una experiencia única y fantástica! A TODOS, sepan que estoy super orgullosa de tenerlos como amigos y que sean parte de mi vida. Gracias, gracias, gracias (como dice una organizadora de Buenos Aires) con todo mi corazón!!!!!!

Je remercie mes amis de Toulouse, réunis par la passion du Tango Argentin : Claudia, Florence, Stéphanie, Jean-Christophe, Daiane et Juan pour leur soutien à toute épreuve ! Je remercie Claudia pour avoir partagé mes premiers voyages à BsAs, mes doutes et mes incertitudes, pour avoir été ma marraine spirituelle de thèse, pour ses corrections de bibliographie, pour son coaching d'avant la soutenance et pour son amitié. Je remercie Stéphanie pour les retouches Photoshop, pour son accompagnement bienveillant jusqu'à l'heure H de la soutenance, le shooting photo, sa gentillesse, sa disponibilité et son amitié indéfectible. Je remercie également mon amie Florence à qui je promets de donner à mon tour dans cinq ans un exemplaire de ma prose, échange de bons procédés. Bien sûr, je la remercie pour son soutien et son amitié. Elle reste ma danseuse de milonga favorite.

Voilà, j'arrive à la fin de ces remerciements : ma famille. Je crois que la personne qui a été la plus impactée au cours de ces quatre années que j'ai dédiées à cette thèse (et au tango dans mon temps libre), c'est Jean-Philippe. Je pense que c'est pour cela même qu'il a cumulé entre juin et aout derniers (donc aux moments les moins opportuns) une commotion cérébrale (légère) et une malléole cassée... c'est forcément un signe... D'ailleurs, je remercie à ce sujet les Hôpitaux de Toulouse et leurs salles d'attente si propices à la rédaction d'intro générale, de résumés... Sans rire, je le remercie pour sa patience, les repas du week-end, le thé du soir, sa compréhension et son soutien. Merci également pour le Pack Office 2017, les MAJ sur Mac, les achats de dernière minute : le câble du rétro, le pointeur laser et..... la bague pomme. Promis, les prochaines vacances seront plus sympas !

Enfin, je tenais à rendre hommage à mon père Hugues, ma sœur Julie et ma mère Anne-Marie qui, même si elle n'est plus parmi nous, a sûrement tout suivi et doit être très fière, du moins je l'espère. Je leur dois ce que je suis. MERCI.

Et comme « le savoir se perd avec celui qui néglige de le transmettre » (R. Guilleaumes, 2008), je m'empresse de conclure et laisse aux lecteurs le soin de découvrir ce manuscrit, en souhaitant que les travaux dont il se fait l'écho puissent enrichir les données existantes et aider de nouveaux thésards sur ce sujet plus que d'actualité.

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE I ETAT DE L'ART BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
1. La pomme, <i>Malus domestica</i> sp.....	7
1. 1. La pomme et les Français.....	7
1. 2. Origines et botanique.....	10
1. 3. De l'arbre au fruit : les aspects biologiques	11
1. 3. 1. L'appareil reproducteur et la pollinisation	11
1. 3. 2. Le développement anatomique du fruit.....	13
1. 4. Cytologie et histologie végétales	15
1. 4. 1. La cellule végétale et la paroi cellulaire	15
1. 4. 2. Biochimie structurale végétale	16
a- Les polysaccharides pariétaux.....	17
b- Les composés non polysaccharidiques	18
1. 5. La composition chimique de <i>Malus domestica</i>	19
1. 5. 1. Composition chimique du fruit	19
1. 5. 2. Composition chimique de l'épiderme des pommes	21
1. 6. Les intrants phytosanitaires	24
1. 6. 1. Historique	26
1. 6. 2. Composition d'un produit phytosanitaire.....	29
a- Les ingrédients actifs.....	29
b- Les tensio-actifs	34
c- Les additifs.....	35
d- les différentes formulations.....	35
1. 6. 3. Les indices de fréquence de traitement des pommes	36
a- Définitions	36
b-Indices de fréquence de traitement des pommes en France	37
2. Une peau à la loupe.....	39
2. 1. La structure de l'épiderme des pommes.....	39
2. 2. Composition de la cuticule	40
2. 2. 1. La cutine.....	41
2. 2. 2 Le cutane.....	43
2. 2. 3. Les lipides cuticulaires solubles	43
a- Composition chimique générale des cires cuticulaires des végétaux	43
b- Composition des cires totales des pommes.....	45
c- Différenciation chimique des cires cuticulaires et de leurs cristaux	47
d- Composition des cires épicuticulaires.....	48
e- Composition des cires intracuticulaires	49
2. 2. 4. Facteurs influençant la cuticule et ses cires	50
2. 2. 5. Microcraquelures et lenticelles	52
a- Les microcraquelures de la surface	52
b- Les lenticelles des pommes.....	54
2. 3. Fractionnement chimique de la cuticule.....	55

2. 3. 1. Extraction sélective des cires épicuticulaires	55
2. 3. 2. Fractionnement pour la caractérisation chimique de l'épiderme et de la cuticule de pommes	60
2. 4. Caractérisation spectroscopiques des lipides cuticulaires des pommes.....	62
2. 4. 1. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.....	62
2. 4. 2. Résonance magnétique nucléaire du ¹³ C solide.....	63
2. 5. Les deux voies de diffusion dans la cuticule.....	65
2. 5. 1. Rôle des lipides cuticulaires	65
2. 5. 2. Distinction entre cires amorphes et cires cristallines : définition de la voie de diffusion apolaire ..	67
2. 5. 3. Caractérisations physico-chimiques des régions amorphes et cristallines	69
a- L'analyse par diffraction des rayons X.....	69
b- La calorimétrie à balayage différentiel	70
c- La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier	71
d- La résonance magnétique nucléaire du ¹³ C en milieu solide	72
2. 5. 4. Le rôle des craquelures et des lenticelles : définition de la voie de diffusion polaire	73
3. Les interactions pesticides-fruits.....	74
3. 1. La pénétration des molécules actives des produits phytosanitaires à la surface des végétaux	75
3. 2. Le mécanisme de la pénétration.....	75
3. 2. 1. Le premier contact : les cires épicuticulaires.....	77
3. 2. 2. Etape 1 de la pénétration : la sorption des molécules.....	77
3. 2. 3. Etape 2 de la pénétration : la diffusion des molécules	78
3. 2. 4. Etape 3 de la pénétration : la désorption des molécules	78
3. 2. 5. Les coefficients de perméance et de diffusion des cuticules.....	78
3. 3. Les paramètres pouvant affecter la pénétration : rôle des plastifiants	80
3. 3. 1. La surface des végétaux.....	81
3. 3. 2. Les propriétés physico-chimiques des matières actives	81
3. 3. 3. Les formulations phytosanitaires.....	82
a- Les tensio-actifs.....	82
b- Les huiles.....	87
c- Les sels d'ammonium	87
3. 3. 4. Les conditions extérieures	87
3. 4. Localisation des molécules dans le fruit.....	88
3. 5. Métabolisation des molécules de phytosanitaires dans la pomme	90
4. Réglementation sur l'usage des produits phytosanitaires et notion de résidus phytosanitaires.....	91
4. 1. La réglementation en France et en Europe.....	91
4. 2. Définition et encadrement légal des résidus phytosanitaires.....	96
5. Les techniques d'analyses des résidus.....	98
5. 1. Les méthodes d'échantillonnage (extraction / purification).....	98
5. 1. 1. Extractions par solvants.....	98
5. 1. 2. Extractions et/ou purifications sur supports solides	101
5. 1. 3. La méthode QuEChERS	106
5. 2. Les méthodes d'analyse	109
5. 2. 1. La chromatographie en phase gazeuse.....	109
5. 2. 2. La chromatographie liquide haute performance	111
5. 2. 3. Les détecteurs de masse et les méthodes multirésidus	113
5. 2. 4. Chromatographie en phase gazeuse vs chromatographie liquide.....	114
5. 2. 5. La chromatographie sur couche mince.....	115

5. 3. Les effets matrice	116
5. 3. 1 Généralités.....	116
5. 3. 2. Les effets matrice en chromatographie en phase gazeuse.....	117
5. 3. 3. Les effets matrices en chromatographie liquide	119
6. Conclusion.....	120
Références bibliographiques.....	123
ANNEXES.....	141
CHAPITRE II ETUDE DE LA COMPOSITION DES EPIDERMES DE POMMES ET DE LA STRUCTURE DES LIPIDES CUTICULAIRES. PROPRIETES CRISTALLINES ET AMORPHES DES CIRES ET DES CUTICULES. ETUDE DES INTERACTIONS MOLECULE ACTIVE - CUTICULE.....	149
1. Introduction.....	152
2. Matériels et méthodes.....	153
2. 1. Sélection des variétés de pommes.....	153
2. 2. Echantillonnage des épidermes	154
2. 3. Caractérisations physico-chimiques des épidermes	155
2. 3. 1. Taux de matière sèche.....	155
2. 3. 2. Taux de matières minérales.....	155
2. 3. 3. Taux de protéines	155
2. 3. 4. Taux de fibres (Cellulose, hémicelluloses, lignines)	155
2. 3. 5. Taux d'extractibles à l'éthanol (Pectines)	155
2. 3. 6. Taux d'hydrosolubles à 20°C (Sucres simples et acides organiques)	156
2. 4. Fractionnement et caractérisation des lipides cuticulaires	157
2. 4. 1. Quantification des cires cuticulaires totales.....	157
2. 4. 2. Quantification de la cutine et du cutane	157
2. 5. Extractions mécaniques des cires cuticulaires	158
2. 5. 1. Extraction par friction de la surface des pommes	158
2. 5. 2. Extraction par un film de gomme arabique.....	158
2. 5. 3. Extraction par cryo-adhésion dans du glycérol.....	158
2. 6. Extractions séquencées des cires cuticulaires sur pommes entières.....	158
2. 7. Caractérisations physico-chimiques des lipides cuticulaires.....	159
2. 7. 1. Analyse de la surface des cires épicuticulaires	159
a- Analyse par cryo-microscopie à balayage	159
b- Evaluation de la mouillabilité de surface	159
2. 7. 2. Analyse des lipides cuticulaires.....	160
a- Analyse par microscopie à balayage	160
b- Analyse par Infra-Rouge à Transformée de Fourier (IRTF).....	160
c- Analyse par RMN du solide ¹³ C.....	160
d- Analyse par diffraction des RX	160
e- Analyse par DSC	161
f- Caractérisation des extraits de cires cuticulaires par CCMHP/UV visible	161
g- Quantification des composés triterpéniques des cires totales par CCMHP/UV visible	161
h- Identification des paraffines et des alcools gras par CPG/DIF et CPG/SM	161

i- Quantification des paraffines des cires totales par CPG/DIF	162
j- Quantification des sucres simples des cires totales et des extraits méthanoliques partiels par CIHP	162
k- Caractérisation des esters de cires par CPG/DIF, CPG/SM et IRTF	163
l- Dosage des anthocyanes totales dans les extraits méthanoliques partiels par spectrophotométrie UV-visible	163
2. 8. Etude de l'interaction de la molécule de fludioxonil dans la cuticule des pommes Fuji par RMN ¹⁹ F en milieu solide	164
2. 8. 1. Préparation des échantillons	164
a- Préparation des cuticules entières	164
b- Préparation des cuticules décirées et des cires	164
c- Sorption du fludioxonil dans les cuticules entières, les cuticules décirées et les cires	164
d- Désorption du fludioxonil	165
2. 8. 2. Evaluation des données dynamiques de la molécule de fludioxonil dans les différentes composantes de la cuticule par RMN du ¹⁹ F en milieu solide	165
3. Résultats et discussion.....	165
3. 1. Caractérisation des épidermes des trois variétés de pommes étudiées.....	168
3. 2. Caractérisation des cuticules des 3 variétés de pommes	171
3. 3. Composition chimique des lipides cuticulaires	173
3. 3. 1. Caractérisations chimiques des lipides cuticulaires par spectroscopie	173
a- Identification des groupes fonctionnels par IRTF :.....	174
b- Identification des groupes fonctionnels par RMN ¹³ C CP-MAS, DP-MAS et INEPT-MAS.....	176
- Identification des polysaccharides pariétaux	176
- Identification des acides triterpéniques	177
- Identification des chaînes alkyles	180
3. 3. 2. Caractérisations chimiques des cires cuticulaires.....	181
3. 3. 2. 1. Caractérisation chimique des cires issues des lysats enzymatiques des épidermes.....	182
a- Les rendements en cires	182
b- Identification des composés majoritaires des cires totales par CCMHP/UV-visible.....	183
c- Quantification des composés triterpéniques par CCMHP/UV-visible.....	185
d- Evaluation du ratio acide ursolique/acide oléanolique par IRTF	186
e- Quantification des hydrocarbures aliphatiques par CPG/DIF	186
f- Mesure de l'angle de goutte des surfaces de peaux et relation avec la composition chimique moyenne des cires cuticulaires.....	187
3. 3. 2. 2. Distinction entre cires épicuticulaires et cires intracuticulaires	189
3. 3. 2. 3. Evaluation de l'extraction des cires épicuticulaires par immersion dans des solvants	191
3. 3. 2. 4. Optimisation du fractionnement des cires cuticulaires par immersions successives des pommes entières dans l'hexane, le chloroforme et le méthanol	194
a- Optimisation des extractions par immersion dans l'hexane	194
b- Optimisation des extractions par immersion dans le chloroforme après immersion hexane.....	195
c- Optimisation des extractions par immersion dans le méthanol après immersions hexane + chloroforme	195
3. 3. 2. 5. Caractérisation chimique des trois séries d'extraits de cires cuticulaires des trois variétés de pommes	196
a- Les rendements en cires :	196
b- Caractérisation chimique des extraits dans l'hexane des cires de pommes	196
c- Caractérisation chimique des extraits dans le chloroforme des cires de pommes.....	201
d- Caractérisation chimique des extraits dans le méthanol des cires de pommes.....	202

e- Bilan comparatif entres cires totales et extraits de cires	204
3. 3. 2. 6. Conclusion	206
3. 4. Caractérisation structurale des lipides cuticulaires	208
3. 4. 1. Caractérisation par analyse de diffraction des RX	208
3. 4. 2. Caractérisation par analyse thermique DSC	210
3. 4. 3. Caractérisation par RMN ¹³ C du solide	213
3. 4. 4. Caractérisation par MEB	216
3. 5. Etude de la dynamique moléculaire du fludioxonil dans la cuticule des pommes (Fuji) par RMN ¹⁹ F du solide.....	225
3. 5. 1. Généralités.....	225
3. 5. 2. Mobilité du fludioxonil dans la cuticule des pommes Fuji.....	226
4. Conclusions.....	232
Références bibliographiques.....	237
CHAPITRE III ETUDE DES EFFETS MATRICE DANS DES EXTRAITS QUECHERS DE POMMES .	243
1. Introduction.....	245
2. Matrix-matching as an improvement strategy for the detection of pesticide residues.....	246
2. 1. Introduction	246
2. 2. Materials and methods	247
2. 2. 1. Target apple varieties	247
a- Apple varieties	247
b- Surface characterization	248
2. 2. 2. Target pesticides.....	248
2. 2. 3. Standards and reagents	248
2. 2. 4. Sample preparation	249
a- Sample preparation.....	249
b- Extraction and clean-up	249
2. 2. 5. Preparation of standards and calibration curves.....	249
a- Preparation of solvent-matched standards	249
b- Preparation of matrix-matched standards.....	249
2. 2. 6. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)	250
2. 2. 7. Validation parameters and quality control	250
2. 2. 8. Statistical analysis	250
2. 3. Results and discussion	251
2. 3. 1. Selection of MS-MS condistions	251
2. 3. 2. Calibration and impact of variety on matrix effects, evaluated for fruit, flesh and peel.....	251
2. 3. 3. Method validation for apple peel	260
2. 3. 4. Analysis of apple samples at harvest	261
2. 4. Conclusions	262
Appendix. Supplementary data	263
3. Evaluation and prevention of the negative matrix effect of terpenoids on pesticide quantification by gas chromatography-tandem mass spectrometry in apples.....	266
3. 1. Introduction	267

3. 2. Materials and methods	268
3. 2. 1. Target apple varieties	268
3. 2. 2. Selection of pesticides and matrix compounds	268
3. 2. 3. Chemicals and materials	269
3. 2. 4. Sample processing and preparation	270
3. 2. 5. Preparation of standards and calibration curves.....	270
a- Preparation of solvent-matched and matrix-matched pesticide standards for GC/MS ⁿ analysis.....	270
b- Preparation of matrix compound standards for HPTLC/UV-Visible characterization and terpenoid quantification	270
3. 2. 6. Extraction of total waxes from apple peels.....	270
3. 2. 7. High-performance thin-layer chromatography coupled with UV-visible spectrophotometry.....	271
a- Chemicals and materials.....	271
b- HPTLC equipment and general procedures.....	271
3. 2. 8. Analysis and quantification of matrix analytes in apple extracts	272
3. 2. 9. Analysis of matrix analytes by the HTpSPE clean-up procedure of Oellig & Schwack 2011 [69]....	272
3. 2. 10. Determination of the total phenolic content of QuEChERS extracts by the method of Folin & Ciocalteu [70]	272
3. 2. 11. Relationship between the matrix effect in GC/MS ² and the amount of matrix compounds in the extracts	273
3. 2. 12. Statistical analysis.....	273
3. 3. Results and discussion	273
3. 3. 1. Study of the target matrix analytes in QuEChERS extracts of apples	273
3. 3. 2. Relationship between negative matrix effects in GC/MS ² ion trap and co-injected matrix analytes	278
3. 3. 3. Relationship between the negative matrix effect observed in GC/MS ² and triterpenic acid contents	278
3. 3. 4. So, what happens during hot splitless injection to suppress the pesticide signal during co-injection with triterpenic acids?.....	280
3. 3. 5. Purification of apple peel QuEChERS extracts by HPTLC, to minimize negative matrix effects in subsequent GC/MS ² ion trap analysis	281
3. 4. Conclusion.....	284
Appendix. Supplementary data	285
4. Conclusion.....	290
Références bibliographiques.....	292
CHAPITRE IV ETUDE DES INTERACTIONS PLASTIFIANTS-PHYTOSANITAIRES-CUTICULE. MISE AU POINT D'UN PROCÉDE INDUSTRIEL DE DECONTAMINATION DES POMMES AVANT COMMERCIALISATION	299
1. Introduction.....	302
2. Matériels et méthodes.....	303
2. 1. Sélection des variétés de pommes.....	303
2. 2. Sélection des résidus phytosanitaires pour le suivi analytique.....	303
2. 3. Mise en œuvre des supports adsorbants solides.....	305

2. 3. 1. Sélection des supports adsorbants	305
2. 3. 2. Principe de la modélisation de l'adsorption des phytosanitaires en phase aqueuse	305
2. 3. 3. Vérification des quantités de matières actives dans les formulations commerciales de pesticides	306
2. 3. 4. Evaluation des taux de recouvrement des résidus phytosanitaires par extraction liquide-liquide	308
2. 3. 5. Les conditions analytiques.....	308
2. 4. Mise en œuvre des supports adsorbants à partir de liquides filmogènes	308
2. 4. 1. Sélection des supports filmogènes	308
2. 4. 2. Formulations des supports filmogènes	309
2. 4. 3. Principe des essais	309
a- Principe de contamination des pommes.....	309
b- Principe de décontamination des pommes	310
2. 4. 4. Blancs matrice et témoins.....	311
2. 4. 5. Préparation des extraits QuEChERS de peaux de pommes	311
2. 4. 6. Analyse des résidus phytosanitaires par CPG-DIF.....	312
2. 4. 7. Analyse des résidus phytosanitaires par CPG-SM.....	312
2. 4. 8. Evaluation des niveaux moyens de contamination à éliminer par les traitements filmogènes	313
2. 5. Mise en œuvre des agents de vectorisation de nature lipidique.....	314
2. 5. 1. Sélection des agents vecteurs.....	314
2. 5. 2. Principe de la modélisation de la décontamination de cires cuticulaires extraites des peaux de pommes de la variété 2	314
a- Extraction des cires cuticulaires totales des pommes de la variété 2	314
b- Préparation des échantillons	315
c- Protocole de décontamination.....	315
d- Préparation de l'extrait pour analyse	315
e- Evaluation des taux de recouvrement des résidus phytosanitaires par dSPE.....	315
f- Représentation des résultats sous forme de diagramme ternaire	316
2. 6. Essais laboratoire de décontamination des pommes pour la mise au point d'un pilote industriel et la proposition d'un procédé visant le zéro résidu détectable	316
2. 6. 1. Sélection des agents de décontamination.....	316
2. 6. 2. Formulations des additifs et procédés de décontamination	318
2. 6. 3. Essais de décontamination avec échantillonnage des peaux par moitié.....	318
2. 7. Evaluation des paramètres de solubilité de Hansen	319
2. 7. 1. Paramètres expérimentaux	319
2. 7. 2. Paramètres théoriques	319
2. 7. 3. Evaluation de l'affinité de deux molécules	319
2. 7. 4. Calcul des volumes molaires des solvants	320
2. 8. Caractérisation des milieux et évaluation de l'efficacité des plastifiants par RMN ¹³ C et ¹⁹ F en milieu solide.....	320
2. 8. 1. Préparation des échantillons	320
a- Préparation des cuticules entières.....	320
b- Préparation des cuticules décirées et des cires	320
c- Sorption du fludioxonil dans les cuticules entières, les cuticules décirées et les cires	320
d- Désorption du fludioxonil par les plastifiants	320
2. 8. 2. Localisation de la molécule de fludioxonil dans la cuticule par RMN du ¹³ C en milieu solide	321
2. 8. 3. Evaluation de l'efficacité des plastifiants sur l'élimination du fludioxonil dans la cuticule et données dynamiques sur le fludioxonil par RMN du ¹⁹ F en milieu solide.....	321
2. 9. Essais de faisabilité d'un procédé de décontamination sur pilote laboratoire MAF Roda	321
2. 9. 1. Principe des essais	321
2. 9. 2. Contamination des pommes et échantillonnage.....	322

2. 9. 3. Déroulement des essais de décontamination sur le pilote laboratoire	323
2. 9. 4. Formulations pour essais	323
2. 9. 5. Préparation des extraits pour analyse par CPG/SM	324
2. 10. Mise en œuvre des essais sur pilote préindustriel MAF Roda en station fruitière	324
2. 10. 1. Sélection des pommes et des traitements	324
2. 10. 2. Pilote préindustriel MAF Roda.....	324
2. 10. 3. Réalisation des essais.....	325
3. Résultats et discussion	327
3. 1. Evaluation des supports adsorbants solides	327
3. 1. 1. Rendements d'extraction du chlorpyrifos-Et/Pyrinex par les supports adsorbants	328
3. 1. 2. Rendements d'extraction du fludioxonil/Geoxe par les supports adsorbants	330
3. 1. 3. Rendements d'extraction du flonicamid/Teppeki par les supports adsorbants.....	331
3. 1. 4. Rendements d'extraction du Boscalid-Pyraclostrobine/Bellis par les supports adsorbants	331
3. 1. 5. Bilan des résultats des essais d'évaluation des supports adsorbants solides.....	332
3. 2. Evaluation des supports adsorbants filmogènes	335
3. 2. 1. Résultats des essais préliminaires de décontamination des pommes de la variété 2	335
3. 2. 2. Résultats des essais de décontamination par supports adsorbants filmogènes 24 heures après la phase de contamination	336
3. 2. 3. Résultats des essais de décontamination par supports adsorbants filmogènes 10 jours après la phase de contamination	339
3. 2. 4. Résultats des essais de décontamination de pommes en sortie de conditionnement par supports adsorbants filmogènes	341
3. 2. 5. Bilan des résultats des essais d'évaluation des supports adsorbants filmogènes	341
3. 3. Evaluation des agents de vectorisation.....	343
3. 3. 1. Evaluation de l'extraction des phytosanitaires en fonction de leurs caractéristiques	344
3. 3. 2. Bilan des résultats des essais d'évaluation des additifs alimentaires comme agents vecteurs.....	346
3. 4. Résultats des essais de mise au point d'une formule de décontamination des pommes	350
3. 4. 1. Essais de vectorisation des résidus phytosanitaires par des plastifiants lipophiles.....	351
3. 4. 2. Evaluation du comportement des plastifiants dans les épidermes des pommes au moyen d'un protocole analytique spécifique. Interprétation des résultats selon la théorie de Hansen	353
3. 4. 3. Evaluation du comportement dans l'épiderme de deux solvants	360
3. 5. Etude de la dynamique moléculaire du fludioxonil dans la membrane cuticulaire de la pomme (variété 2) en présence de plastifiants par RMN ¹⁹ F du solide	361
3. 5. 1. Etude de l'effet des plastifiants sur la mobilité du fludioxonil dans les cuticules de pommes de la variété 2.....	361
3. 5. 2. Etude de l'effet plastifiant sur la structure de la cuticule par RMN ¹³ C du solide	365
3. 5. 3. Bilan	366
3. 6. Résultats des essais de faisabilité d'un procédé de décontamination sur pilote laboratoire.....	369
4. Essais de décontamination sur pilote préindustriel en station fruitière.....	370
4. 1. Présentation du pilote	371
4. 2. Critères de sélection des adsorbants et des pommes pour les essais sur pilote industriel	374
4. 3. Les paramètres variables des essais.....	376
4. 4. Résultats des essais de décontamination des pommes sur pilote préindustriel	377
4. 4. 1. Influence de la composition des solutions de traitement	379
4. 4. 2. Influence de la durée des immersions	382
4. 4. 3. Influence du procédé d'application	383
4. 4. 4. Comparaison des additifs MCT et E1518 en premier bain de décontamination (rinçage acétone).....	384

4. 4. 5. Influence de l'organisation des bains dans le développement du procédé.....	384
4. 5. Proposition d'un schéma de désorption des résidus dans la cuticule selon les théories de Hansen, de Hildebrand-Scatchard et des volumes libres	386
4. 6. Bilan des essais de décontamination sur pommes en pilote préindustriel.....	387
5. Conclusion.....	388
Références bibliographiques.....	391
Annexes.....	394
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	405

Liste des abréviations

AESA : Autorité Européenne de Sécurité des Aliments ou EFSA : European Food Safety Agency

ACN : Acétonitrile

ADF : *Acid Detergent Fiber*, détermination des lignines et de la cellulose

AMM : Autorisation de mise sur le marché

ANPP : Association Nationale Pomme Poire

ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

AOAC : *Association Of Analytical Communities*

APCI : *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, ionisation chimique à pression atmosphérique

APG : Alkylpolyglucosides

API : *Atmospheric Pressure Ionization*, ionisation à pression atmosphérique

ASE : *Accelerated Solvent Extraction*, extraction accélérée par solvant

β' : Sélectivité de taille de la membrane cuticulaire

BSV : Bulletins de Santé des Végétaux

C : Cellulose

CCM : Chromatographie sur couche mince

CCMHP : Chromatographie sur couche mince haute performance

CE : Communauté Européenne

CEE-NU : Commission Economique des Nations Unies pour l'Europe

CEFEL : Centre d'Expérimentation en Fruits Et Légumes

CEN : Comité Européen de Normalisation

CHCl₃ : Chloroforme

CIHP : Chromatographie ionique haute performance

CLHP : Chromatographie liquide haute performance

CLHPU : Chromatographie liquide haute performance ultra-rapide

CMC : Concentration micellaire critique

CMEAB : Centre de Microscopie Electronique Appliquée à la Biologie

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

CSA : *Chemical Shift Anisotropy*, anisotropie de déplacement chimique

cv : Cultivar (*CULTivated VARIety*)

δ : Déplacement chimique en ppm (RMN)

δD : Paramètre de diffusion de Hansen

δP : Paramètre de polarité de Hansen

δH : Paramètre de liaison hydrogène de Hansen

D : Coefficient de diffusion

D^0 : Coefficient de diffusion d'un soluté de volume molaire nul
Da : Dalton (g/mol)
DA : Dose Appliquée par hectare
DAR : Délai avant récolte
DART : *Direct Analysis in Real Time*
DCE : Détecteur à capture d'électrons
DDT 82 : Direction Départementale des Territoires (Tarn & Garonne)
DESI : *Desorption ionSpray Ionization*
DGAL : Direction Générale de l'Alimentation
DG Sanco : Direction Générale de la SANTé des Consommateurs
DH : Dose Homologuée par hectare
DIF : Détecteur à ionisation de flamme
DMSO : Diméthylsulfoxyde
 $\Delta_{v1/2}$: Largeur de raie à mi-hauteur en Hertz (RMN)
DNP : Détecteur azote-phosphore
DPF : Détecteur à photométrie de flamme
DPX : *Disposable Pipette Xtraction*
DSC : *Differential Scanning Calorimetry*, calorimétrie à balayage différentiel
DTI : Détecteur thermo-ionique
EFSA : *European Food Safety Agency* ou AESA : Autorité Européenne de Sécurité des Aliments
EtOH : Ethanol
ELL : Extraction liquide-liquide
EM : Effet matrice
ESL : Extraction solide-liquide
ESP : Electrospray
ET : Ecart-type
FDA : *Food and Drug Administration*
FM : Facteur matrice
FREDEC : Fédérations Regionales de Défense contre les Ennemis des Cultures
FREDON: Fédérations REgionales de Défense contre les Organismes Nuisibles (anciennement FREDEC)
GCB : *Graphitized Carbon Black*
GMS : Monostéarate de glycérol
GPC : Chromatographie par perméation de gel
H ou Hc : Hémicelluloses
HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HCL : Hémicelluloses, cellulose, lignines

HCl : Acide chlorhydrique

He : Hélium

HLB : *Hydrophilic Lipophilic Balance*, balance hydrophile-lipophile

HSP : *Hansen Solubility Parameters*, paramètres de solubilité de Hansen

l_{BC} : longueur du chemin de diffusion de la barrière cuticulaire (BC)

IFT : Indice de Fréquence de Traitement

INERIS : Institut National de l'Environnement industriel et des RISques

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

INTERFEL : INTERprofession des Fruits Et Légumes frais

IRAC : *Insecticides Resistance Action Committee*

IR : Indice de rétention

IR ou IRTF : Infrarouge à transformée de Fourier

IS : Standard interne

ISP : Ionspray

J : Taux de pénétration cuticulaire

k^* : Mobilité

k^{*0} : Mobilité d'un soluté de volume molaire nul

KBr : Bromure de potassium

L : Lignines

LD : Limite de détection

LMR : Limite Maximale de Résidu

LNE Laboratoire National de Métrologie et d'Essais

Log Kow : Coefficient de partage octanol/eau

LPME : *Liquid Phase MicroExtraction*, extraction liquide sur membranes polymériques

LQ : Limite de quantification

MAE : *Microwaves Assisted Extraction*, extraction assistée par microondes

MCT : *Medium Chain Triglycerides*, triglycérides à chaîne moyenne

MEB : Microscopie à balayage électronique

MeOH : Méthanol

MM : Masse molaire (g/mol)

MS : Masse sèche

MSPD : Matrix Solid Phase Dispersion, dispersion sur matrice solide

MSPE : *Magnetic Solid Phase Extraction*, extraction sur phase solide magnétique

MTBE : Methyl tertio-butyl éther

M/V : Masse à volume

NDF : *Neutral Detergent Fiber*, détermination des lignines, cellulose et hémicelluloses

NTK : *Nitrogen Total Kjeldhal*, azote total Kjeldhal

OP : Organisation des producteurs

ORP : Observatoire des Résidus de Pesticides

P : Perméabilité

pKa : Constante d'acidité

PGPR : Polyrinicoléate de polyglycérol

PNUE : Programme des Nations Unies pour l'Environnement

POP : Polluants organiques persistants

PPT : Produit Phytosanitaire de Traitement

PS : polysaccharides

PSA : *Primary Secondary Amine*

PTFE : Polytétrafluoroéthylène

Q : Quadrapôle

QuEChERS : *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe extraction*

Ra : Distance entre deux composés dans l'espace de solubilité de Hansen

RO : Rayon de la sphère de solubilité de Hansen

RAP : Règlement d'Administration Publique

RED : Relative Energy Difference, $RED = Ra/RO$

Rf : *Retardation factor*, facteur de rétention

RMN CP-MAS : Résonance Magnétique Nucléaire par polarisation croisée à l'angle magique de rotation (*Cross Polarization at Magic Angle Spinning*)

RMN DP-MAS : Résonance Magnétique Nucléaire par polarisation directe à l'angle magique de rotation (*Direct Polarization at Magic Angle Spinning*)

RMN INEPT-MAS : Résonance Magnétique Nucléaire (*Insensitive Nuclei Enhancement at Magic Angle Spinning*)

Rpm : Rounds per minute = nombre de tours par minute

RP-SPE : *Reversed Phase - Solid Phase Extraction*, extraction sur phase solide inverse

RSD : *Relative Standard Deviation*, erreur relative standard

S : Coefficient de sorption

SBSE : Stir Bar Sorptive Extraction, extraction par sorption sur un polymère

SFE : *Supercritical Fluid Extraction*, extraction par fluide supercritique

SIRIS : Système d'Intégration des Risques par Intégration des Scores

SM : Spectrométrie de masse

SM² : Spectrométrie de masse tandem

SMⁿ : Spectrométrie de masse multi-étages

SMS : Monostéarate de sorbitan

SPE : *Solid Phase Extraction*, extraction sur phase solide

SPed ou dSPE : *Dispersive Solid Phase Extraction*, extraction sur phase solide dispersive

SPME : *Solid Phase MicroExtraction*, microextraction sur phase solide

STS : Tristéarate de sorbitan

TDCPP : Tris(1,3-dichloro-2-propyl)phosphate

TEG : Triéthylène glycol

Tg : *Glass Transition*, température de transition vitreuse

THF : Tétrahydrofurane

TMSH : *Trimethylsulfonium hydroxide*

TNFA : Acide 4-trifluorométhyl nicotinique (métabolite du flonicamid)

TNFG : N-(4-trifluorométhylnicotinoyl glycine) (métabolite du flonicamid)

TOF : *Time of Flight*, analyseur à temps de vol

UE : *Ultrasonic Extraction*, extraction assistée par ultrasons

UHQ : Eau ultra-haute qualité

U/L ou mg : Unités formant colonies par litre ou par milligramme

UNEP : *United Nations of Environment Program*

US : Ultrasons

VM ou Vm : Volume molaire (mL/mol)

V/V : Volume à volume

Liste des figures

Chapitre I

Figure I-1 : Table variétale des pommes en France [5]	8
Figure I-2 : Répartition de la production de pommes de table en France (Agreste 2012 [7]).....	9
Figure I-3 : Feuilles de pommier Smoothie (Ecolothèque de Montpellier)	11
Figure I-4 : Appareil reproducteur de la fleur de pommier (A) et anatomie du fruit en coupes longitudinale (B) et transversale (C) d'après Prat 2010 [16] et Bowes 2012 [17]	12
Figure I-5 : Phase de nouaison (d'après C. Minost, Stades phénologiques du pommier, sur www7.inra.fr, consulté le 31 Janvier 2016).....	13
Figure I-6 : Cycles des fruits climactériques et non climactériques (Laville 1994 [19])	14
Figure I-7 : Schéma de la cellule végétale d'après Campbell <i>et al.</i> 2004 [20]	15
Figure I-8 : Paroi cellulaire végétale schématisée (A) d'après Colin-Henrion 2008 [18] et observée au MET (B) d'après Campbell <i>et al.</i> 2004 [20]	16
Figure I-9 : Les principaux constituants des fibres alimentaires d'après Colin-Henrion 2008 [18]	17
Figure I-10 : Formation de liège sur une pomme	19
Figure I-11 : Coupe transversale d'un épiderme de pomme Gala observée sur microscope Leica DM LB après coloration des substances lipidiques au Soudan IV d'après Tessmer <i>et al.</i> 2012 [34]....	23
Figure I-12 : Production des Vergers du Sud : disponibilité saisonnière des différentes variétés de pommes (Données Blue Whale).....	25
Figure I-13 : Les points essentiels du développement des produits phytosanitaires d'après Bonnefoy 2012 [36] , ORP [37] et LNE 2008 [39]	27
Figure I-14 : Historique de l'évolution des trois grandes familles des produits phytosanitaires au XX ^e siècle d'après Bonnefoy 2012 [37]	28
Figure I-15 : Codes internationaux pour l'identification du type de formulation des phytosanitaires d'après Herzfeld et Sargent 2011 [42].....	36
Figure I-16 : Informations types disponibles sur la base de données gouvernementale (Exemple d'un fongicide : le dithianon (spécialité commerciale Delan WG).....	36
Figure I-17 : Représentation des IFT moyens totaux pour les principales cultures en France en 2006 d'après Butault <i>et al.</i> 2010 [53]	37
Figure I-18 : Répartition des traitements antifongiques et insecticides en France en 2011 d'après Agreste Primeur 2015 [54]	38

Figure I-19 : Coupe transversale d'épidermes de pomme Braeburn (a) observé au microscope Trino Topic T avec un objectif x10 d'après Schotsmans <i>et al.</i> 2004 [57] et de pomme Boskoop (b) observé au microscope Jenaval Contrast à 120 kV d'après Konarska 2012 [58]	39
Figure I-20 : Schéma général de la cuticule épidermique d'après Ketata 2012 [65].....	40
Figure I-21 : Analyse de l'ultrastructure des cuticules de pommes Ligol (a), Szampion (a) et Jonagold (b) au microscope électronique à transmission FEI Technai G2 Spirit Bio TWIN à 120 kV d'après Konarska 2012 [58] et 2014 [66]	40
Figure I-22 : Les différents monomères de la cutine d'après Molina 2010 [69].....	41
Figure I-23 : Structure possible d'un polymère de cutine riche en acides gras ω -hydroxylés d'après Molina 2010 [69]	42
Figure I-24 : Structure modélisée d'une section de polymère de cutine d'après Heredia <i>et al.</i> 2000 [72]	42
Figure I-25 : Observation microscopique de l'épiderme de pommes Szampion (a et b) et Jonagold (c et d) respectivement avant et après stockage d'après Konarska 2012 [58]	51
Figure I-26 : Graphique représentant la surface d'une sphère en fonction de son diamètre d'après Curry 2003 [94].....	53
Figure I-27 : Microcraquelures à la surface de pommes Szampio (a et b) et Jonagold (c et d) après 6 mois de stockage en atmosphère contrôlée d'après Konarska 2012 [58]	53
Figure I-28 : Observation d'un stomate par MEB (a) et sa représentation schématique en coupe (b) d'après Prat 2005 [101].....	54
Figure I-29 : Différentes formes de lenticelles à divers stades de développement sur les épidermes de pommes Szampion (a, e, f) et Jonagold (b, c, d) observées par MEB d'après Konarska 2012 [58]	55
Figure I-30 : Micrographes (MEB) de cires épicuticulaires de <i>Gypsophi acutifo</i> : (a) cristaux et film sous-jacent de cires épicuticulaires isolés par TEG, (b) cristaux isolés par du glycérol d'après Ensikat <i>et al.</i> 2000 [103].....	57
Figure I-31 : Micrographes (MEB) (a) de la surface adaxiale de feuilles de <i>Prunus laurocerasus</i> après cryo-extractions (glycérol), (b) le film de cires épicuticulaires obtenu d'après Jetter <i>et al.</i> 2000 [85], (c) de la surface adhésive de la plante carnivore <i>Nepenthes alata</i> après une cryo-adhésion, (d) après 5 cryo-adhésions d'après Riedel <i>et al.</i> 2003 [86]	58
Figure I-32 : Schéma de synthèse pour le fractionnement et la caractérisation chimique de l'épiderme de la pomme (en bleu) et en particulier de la cuticule (en rose)	60
Figure I-33 : Micrographes de coupes transversales d'épidermes de pommes Szampion (a) et Jonagold (b) par MEB TESCAN/VEGA LMU à 30 kV d'après Konarska 2012 [58]	61

Figure I-34 : Spectres IRTF de différentes fractions d'épiderme de pommes d'après Johnson <i>et al.</i> 2007 [74]	63
Figure I-35 : Spectres RMN CP-MAS du ¹³ C solide de différentes fractions de l'épiderme de pomme d'après Johnson <i>et al.</i> 2007 [74]	64
Figure I-36 : Micrographes de la surface de pommes Golden Delicious x2500 (1) et de la surface après abrasion de Granny Smith x6500 (2) d'après Hall 1966 [105].....	65
Figure I-37 : Représentation schématisée de la structure moléculaire des cires cuticulaires (1) d'après Riederer et Schreiber 1995 [126] et diagramme de phase des cires en fonction de la température (2) d'après Reynhardt et Riederer 1994 [131]	67
Figure I-38 : Représentation schématique de la voie de diffusion apolaire dans des cires recristallisées de feuilles de <i>Hordeum vulgare</i> d'après Schreiber <i>et al.</i> 1997 [133]	69
Figure I-39 : Radiogramme des cires épicuticulaires de pommes Ontario, isolées mécaniquement d'après Ensikat <i>et al.</i> 2006 [106]	70
Figure I-40 : Thermogrammes des cuticules de tomates (1a) isolée, (1b) décirée, (2) de la cutine, (3) des cires épicuticulaires et(4) intracuticulaires d'après Luque et Heredia 1994 [109]	70
Figure I-41 : Spectres IRTF des différents constituants de la cuticule de pomme d'après Chen <i>et al.</i> 2008 [73]	72
Figure I-42 : Spectres de RMN CP-MAS du ¹³ C de la cuticule et des cires du kaki d'après Tsubaki <i>et al.</i> 2013 [91]	73
Figure I-43 : Schéma d'une membrane traversée par un pore d'après Schönherr 2006 [134].....	73
Figure I-44 : Schéma de pénétration des molécules bioactives à la surface des végétaux selon le chemin de diffusion apolaire d'après Pollard <i>et al.</i> 2008 [60] , Buchholz 2006 [141] , Riederer 1990 [143]	76
Figure I-45 : Représentation de la mouillabilité de l'épiderme des végétaux par la mesure de l'angle de contact entre la gouttelette d'aérosol et les cires épicuticulaires	77
Figure I-46 : Schéma de l'expérience de désorption unilatérale de la couche externe de la cuticule des végétaux d'après Buchholz 2006 [141]	83
Figure I-47 : Spectres de RMN ¹³ C par CP-MAS de différentes fractions de cuticules de feuilles de <i>Agave americana</i> et de cuticules de tomates avec et sans addition d'amétryne d'après Shechter <i>et al.</i> 2006 [112]	85
Figure I-48 : Taux de recouvrement d'insecticides marqués au ¹⁴ C dans différents segments de pommes après 24 heures d'exposition, (A) pour un traitement à dose élevée, (B) pour un traitement à dose faible d'après Mota-Sanchez <i>et al.</i> 2012 [146]	86
Figure I-49 : Observation au microscope laser confocal de la pénétration de deux pesticides (A) hydrophile et (B) lipophile à travers la cuticule d'une pomme d'après Liu 2006 [158]	88

Figure I-50 : Coupes transversales de feuilles de feuilles de <i>Zea mays</i> observées par microscopie biphotonique d'excitation (TPEM), (a) avant contamination, (b) au moment de la contamination par l'antracène, (c) 96 heures après contamination et représentation schématique de la pénétration de l'antracène dans les feuilles de <i>Z. mays</i> d'après Wild <i>et al.</i> 2004 [147].....	89
Figure I-51 : Localisation du chlorpyrifos-méthyl dans des pommes d'après Riccio <i>et al.</i> 2006 [160]..	90
Figure I-52 : Différentes techniques d'extraction-purification sur supports solides : (A) SPE, (B) interactions impliquées en MSPE d'après Ibarra <i>et al.</i> 2015 [188], (C) DPX, (D) SPME, (E) SDBS	102
Figure I-53 : Illustration des étapes de préparation de l'extrait de pesticides à partir d'une matrice fruit (Restek).....	108
Figure I-54 : Illustration de l'effet matrice positif en CPG d'après Hajslova et Zrostlikova 2003 [221]	117
Figure I-55 : Effets matrice mesurés dans différents échantillons de sol (A), de pomme de terre (B), d'eau (C), de pomme (D), d'ananas (E), de raisin (F) et de tomate (G) d'après De Sousa <i>et al.</i> 2012 [233]	118
Figure I-56 : Séparation du dichlorvos et de la matrice pommes d'après Hajslova et Zrostlikova 2003 [221]	119

Chapitre II

Figure II-1 : Echantillonnage des épidermes au moyen d'un épluche-pomme mécanique	154
Figure II-2 : Platine cryo du microscope à balayage FEI Quanta 250 FEG	159
Figure II-3 : Cinétique de sorption du Geoxe (50 % de fludioxonil) dans des cuticules lysées de pommes Fuji à $21 \pm 1^\circ\text{C}$	164
Figure II-4 : Schéma de fractionnement des épidermes de pommes pour leur caractérisation	166
Figure II-5 : Epidermes lyophilisés puis broyés des trois variétés de pommes étudiés.....	167
Figure II-6 : Echantillonnage des cuticules entières, cuticules décirées et cires totales des trois variétés de pommes étudiées	167
Figure II-7 : Représentation graphique du bilan matière des épidermes des trois variétés de pommes étudiées.....	170
Figure II-8 : Micrographes de coupes transversales d'épidermes de Pink Lady (VAR3) observées au cryo-MEB FEI Quanta 250 FEG à 10 kV et d'épidermes de Szampion (a) et Jonagold (b) au MEB TESCAN/VEGA LMU à 30 kv d'après Konarska 2012 [7]	171
Figure II-9 :Micrographes de cuticules de Fuji (VAR2) après lyse enzymatique, observées au MEB FEI Quanta 250 FEG à 5 kV	172

Figure II-10 : Récapitulatif des bilans matières des lipides cuticulaires des trois variétés de pommes Gala (VAR1), Fuji (VAR2) et Pink Lady (VAR3).	172
Figure II-11 : Identification par RMN CP-MAS Quant du ¹³ C solide des groupes fonctionnels majoritaires des molécules constituant les cuticules entières, les cires totales et les cuticules décirées des épidermes de pommes (Exemple de VAR2)	176
Figure II-12 : Identification par RMN CP-MAS des polysaccharides pariétaux dans les différentes composantes des épidermes des pommes Fuji (VAR2) et Pink Lady (VAR3)	177
Figure II-13 : Identification par RMN CP-MAS des acides triterpéniques dans les différentes composantes des épidermes des pommes Fuji (VAR2) et Pink Lady (VAR3) et (1) formule développée de l'acide oléanolique.....	178
Figure II-14 : Identification par RMN CP-MAS des chaînes carbonées dans les différentes composantes des épidermes des pommes Fuji (VAR2).....	179
Figure II-15 : Identification par RMN DP-MAS des esters et des carbones éthyléniques dans les cires cuticulaires (VAR2)	179
Figure II-16 : Identification par RMN CP-MAS des chaînes hydrocarbonées des cires et des cuticules de pommes, (A) mise en évidence des composants spécifiques des cires, (B) mise en évidence des composés des cires et de la cutine (VAR2)	180
Figure II-17 : Profils CCMHP et densitogrammes à 500nm après dérivatisation à la vanilline sulfurique des cires cuticulaires totales des épidermes de pommes et des étalons chimiques (Variétés 1, 2 et 3)	184
Figure II-18 : Formules développées des acides triterpéniques identifiés dans les cires cuticulaires des épidermes des pommes	185
Figure II-19 : Répartition centésimale de la composition en hydrocarbures aliphatiques identifiés dans les cires cuticulaires totales des épidermes des pommes (Variétés 1, 2 et 3)	187
Figure II-20 : Profils CCMHP après dérivatisation à la vanilline sulfurique, densitogrammes associés avant dérivatisation à 200 nm et spectres IRTF des extraits de cires épicuticulaires par extractions mécaniques (VAR2)	190
Figure II-21 : Profils CCMHP après dérivatisation à la vanilline sulfurique, densitogrammes associés avant dérivatisation à 200 nm et spectres IRTF des extraits de cires épicuticulaires par immersion dans l'hexane (VAR2)	192
Figure II-22 : Micrographes des surfaces des épidermes de pommes avant et après immersion des fruits entiers de 2 minutes dans l'hexane	193
Figure II-23 : Optimisation des extractions des cires par immersion dans l'hexane	194
Figure II-24 : Optimisation des extractions des cires par immersion des fruits dans le chloroforme après immersions dans l'hexane (5 immersions de 15 minutes)	195

Figure II-25 : Aspects des pommes au cours des immersion successives dans les solvants	195
Figure II-26 : Caractérisation chimique des extraits de cires dans l'hexane par CCMHP/UV-Visible et par IRTF (Variété 2).....	197
Figure II-27 : Spectres IRTF des extraits de cires à l'hexane avant et après saponification selon le protocole interne (Variété 2)	200
Figure II-28 : Caractérisation chimique des extraits de cires dans le chloroforme par CCMHP/UV-Visible et par IRTF (Variété 2)	201
Figure II-29 : Caractérisation chimique des extraits de cires dans le méthanol par CCMHP/UV-Visible et par IRTF (Variété 2)	203
Figure II-30 : Diffractogrammes RX des lipides cuticulaires des épidermes de pommes (Variétés 1, 2 et 3)	209
Figure II-31 : Thermogrammes DSC TOPEM des différentes composantes de la cuticule (Variété 3)	211
Figure II-32 : Analyses par RMN du ¹³ C du solide des cires (A), des cuticules décirées (B) et des cuticules entières (C) des épidermes de pommes (Variétés 1, 2 et 3)	215
Figure II-33 : Micrographes des cuticules isolées des épidermes de pommes (Variétés 1, 2 et 3)	216
Figure II-34 : Micromorphologie des cires épicuticulaires des épidermes de pommes (Variétés 1, 2 et 3)	218
Figure II-35 : Micrographes des lenticelles (a) et des craquelures (b) et de leurs cristaux de cires (Variétés 1, 2 et 3)	220
Figure II-36 : Micrographes des faces internes des cuticules avant et après décirage (Variétés 1, 2 et 3)	222
Figure II-37 : Micrographes des faces externes des cuticules avant et après décirage (Variétés 1, 2 et 3)	223
Figure II-38 : Micrographes des cuticules de pommes (Variétés 2 et 3)	224
Figure II-39 : Spectres RMN du ¹⁹ F en milieu solide du fludioxonil étalon chimique (a), du Geoxe (b), du fludioxonil sorbé à 0,14 % dans les cuticules entières (c), à 0,14 % dans les cuticules décirées (d), à 0,14 % dans les cires (e) et à 1,4 % dans les cires (f)	227
Figure II-40 : Schéma théorique des différentes possibilités de l'organisation structurale du fludioxonil dans la cuticule des pommes	232
Figure II-41 : Proposition d'un schéma possible de l'ultrastructure de la cuticule des pommes en coupe transversale	236

Chapitre III

Figure III-1: Representative chromatogram of the 11 pesticides, isotopically labeled injection internal standard (IL-IS) and (TDCPP ; 0.01 g/L in ethyl acetate) as procedural internal standard (P-IS) in scan mode	251
Figure III-2: Example of calibration curves for solvent-matched and matrix-matched standards	253
Figure III-3: ME calculated with and without normalization against internal standards	255
Figure III-4: Loading and score plots for the first two principal components (F1 and F2) of the PCA models for ME evaluations. F1 and F2 explained (a) 98.11%, (b) 98.26% and (c) 93.80% of the variation in the dataset	256
Figure III-5: FDA of ME data for six pesticides, between apple extracts, according to the origin of the extract (peel, flesh and fruit).....	258
Figure III-6: Observation plot of FDA on ME based on ME data processing methods. F1 was significantly discriminant ($p = 0.005$) whereas F2 was not ($p > 0.05$)	259
Figure III-7: Characterization of the surface of the three apples	260
Figure III-8: Overview of pesticide residues in harvest apples calculated for the three varieties, for the whole fruit (a) and the peel (b)	262
<i>Appendix. Supplementary data</i>	
Figure A.1: TIC, spectrum and influence of CID voltage on progeny ion area for (a) boscalid ($m/z = 139.9$) and (b) flonicamid ($m/z = 173.8$).....	264
Figure A.2: Spectra for (a) chlorpyrifos and (b) flonicamid at 0.5, 1, 2 and 3 V applied.....	265
Figure III-9: HPTLC (Silica Gel plates) profiles and densitograms for matrix analyte standards before (A) and after (B and C) derivatization with anisaldehyde reagent	274
Figure III-10: HPTLC (Silica Gel plates) profiles (A) and densitograms at 500 nm (B) after derivatization with anisaldehyde of QuEChERS extracts of apples from VAR1 (a), VAR2 (b), and VAR3(c)	276
Figure III-11: Mean terpenoid and polyphenol concentrations ($n = 5$) in QuEChERS extracts from different apple matrices	277
Figure III-12: Linear regression between the matrix effect and triterpenic acid content in the different apple matrices	279
Figure III-13: Densitograms at 200 nm of pesticide and triterpenic acid standards on (A) HPTLC NH_2 plates after prederivatization with formic acid (2 % in acetonitrile), (B) HPTLC NH_2 plates without prederivatization and (B') HPTLC Silica Gel plates without prederivatization, based on the HTpSPE clean-up method developed by Oellig and Schwack 2011 [69]	282

Figure III-14: (A) Densitograms of QuEChERS extracts of peel spiked with pesticide standards before and after chemical derivatization at 200 nm (in gray) and 500 nm (in black), and (B) HPTLC/UV-Visible characterization of terpenoids in apple cuticular waxes	283
---	-----

Appendix. Supplementary data

Figure A.1: Densitograms of QuEChERS extracts of fruit, flesh and peel of the three varieties of apples. Identification of the matrix compounds (MCi) detected in 1 μ L of QuEChERS extract by HPTLC-UV-Visible at 500 nm, on Silica Gel plates after chemical derivatization with anisylaldehyde reagent.....	286
Figure A.2: Validation of the method for quantifying triterpenoids by HPTLC-UV-Visible.....	287
Figure A.3: QuEChERS extracts of apple peel.....	288
Figure A.4: Triterpenic acid and pesticide molecules.....	289

Chapitre IV

Figure IV-1 : Taux de recouvrement évalués par CPG/DIF des molécules de phytosanitaires formulées commercialement, après extraction liquide-liquide	307
Figure IV-2 : Application des agents filmogènes au pinceau	310
Figure IV-3 : Teneurs en boscalid et en pyraclostrobine des différents témoins après contamination des pommes Fuji par Bellis.....	313
Figure IV-4 : Pilote laboratoire MAF Roda.....	322
Figure IV-5 : Pilote préindustriel en station fruitière	324
Figure IV-6 : Résultats des essais d'adsorption du chlorpyrifos-éthyl / Pyrinex à la dose homologuée de 500 ng/ μ L dans l'eau (Annexe 2)	328
Figure IV-7 : Résultats des essais d'adsorption du chlorpyrifos-éthyl / Pyrinex à 0,5 ng/ μ L et à 10 ng/ μ L dans l'eau (Annexes 3 et 4)	330
Figure IV-8 : Résultats des essais d'adsorption du fludioxonil / Geoxe à 400 ng/ μ L dans l'eau (Annexe 5)	330
Figure IV-9 : Résultats des essais d'adsorption du flonicamid / Teppeki à 140 ng/ μ L dans l'eau (Annexe 6)	331
Figure IV-10 : Résultats des essais d'adsorption du boscalid et de la pyraclostrobine / Bellis à 800 ng/ μ L dans l'eau (Annexe 7)	332
Figure IV-11 : Diagramme bulle représentant le taux d'extraction en fonction de la quantité d'adsorbants (surface des bulles) et du caractère lipophile des phytosanitaires ($\log K_{O/E}$)	334

Figure IV-12 : Taux d'extraction du boscalid et de la pyraclostrobine par différents traitements à base de (a) polysaccharides et (b) pectines et gommes additivées, 24 heures après l'application de la contamination par Bellis sur les pommes (variété 2)	337
Figure IV-13 : Comparaison des taux d'extraction du boscalid de la pyraclostrobine (A) par les traitements en batch de 15 minutes à base de gommes (S1-6, S2), de pectines (S3 ou S4) et d'alginate (S5), appliqués 24 heures après et 10 jours après la contamination des pommes par Bellis (Variété 2). (B) Effet de l'augmentation de la durée du batch.....	340
Figure IV-14 : Schématisation du niveau de pénétration des molécules de phytosanitaires dans l'épiderme des pommes au cours du temps et impact sur le procédé de décontamination	342
Figure IV-15 : Mise en évidence des différences de mouillabilité des surfaces des cires recristallisées par différents agents	345
Figure IV-16 : Diagrammes ternaires représentant la composition de la phase liquide d'extraction	348-349
Figure IV-17 : Schéma d'action des plastifiants pour l'extraction du fludioxonil dans les cuticules de pommes.....	354
Figure IV-18 : Sphères de solubilité selon Hansen	356
Figure IV-19 : Spectres de RMN ¹⁹ F de (a) cuticules de pommes (Variété 2) + 0,14 % fludioxonil, en présence de (b) MCT, (c) E495) et (d) E492).....	363
Figure IV-20 : Impact des caractéristiques des plastifiants sur leur efficacité	364
Figure IV-21 : Spectres de RMN du ¹³ C CP-MAS et DP-MAS des cires et des cuticules décirées des épidermes de pommes (variété 2) avec et sans triacétine (E1518)	366
Figure IV-22 : Schéma théorique des interactions plastifiant/fludioxonil dans la cuticule, en fonction des propriétés des plastifiants et du temps.	368
Figure IV-23 : Taux d'extraction des essais de faisabilité d'un procédé de décontamination sur pilote laboratoire.....	369
Figure IV-24 : Vue en coupe du pilote industriel LCA.....	372
Figure IV-25 : Echantillonnage des pommes avant essais sur pilote industriel.....	373
Figure IV-26 : Exemple de pommes dans un bain de traitement (A) en mode d'immersion statique, (B) sous l'action des douches de recirculation de la solution du bain	374
Figure IV-27 : Influence de la composition de la solution de traitement sur la teneur en boscalid après un batch unique d'immersion	380
Figure IV-28 : Influence de la composition de la solution de traitement sur la teneur en boscalid après trois batches d'immersion.....	381

Figure IV-29 : Influence sur la teneur en boscalid de la dilution des solvants dans E1518 dans la troisième étape de traitement avant rinçage	382
Figure IV-30 : Influence de la durée des traitements par immersion sur la teneur en boscalid	383
Figure IV-31 : Influence du procédé d'application des traitements (immersion ou vaporisation) sur la teneur résiduelle en boscalid	383
Figure IV-32 : Comparaison MCT et triacétine (E1518) pour un traitement par immersion.....	384
Figure IV-33 : Influence de l'organisation des bains successifs sur la teneur résiduelle en boscalid ..	385
Figure IV-34 : Propositions schématiques du procédé de décontamination des pommes	388

Liste des tableaux

Chapitre I

Tableau I-1 : Répartition de la superficie de pommiers par variété en Midi-Pyrénées en 2007 (Agreste 2008 [8])	9
Tableau I-2 : Taxonomie de la pomme domestique d'après Ziadi 2001 [9]	10
Tableau I-3 : Composition chimique générale de la pomme d'après Colin-Henrion 2008 [18] et Wu <i>et al.</i> 2007 [25]	20
Tableau I-4 : Caractérisation chimique des fibres pariétales du réceptacle charnu de pomme d'après Massiot <i>et al.</i> 1997 [26].....	20
Tableau I-5 : Teneurs en glucides, acides organiques et polyphénols des réceptacles charnus de pommes Gala, Fuji et Pink Lady à maturité d'après Bureau <i>et al.</i> 2012 [28]	21
Tableau I-6 : Composition chimique générale de l'épiderme des pommes d'après Colin-Henrion 2008 [18], Massiot <i>et al.</i> 1994 [22], Wu <i>et al.</i> 2007 [23], Verdu 2013 [29], Travers 2002 [30], Veberic <i>et al.</i> 2005 [31] et Awad <i>et al.</i> 2000 [32]	22
Tableau I-7 : Répartition des teneurs en sucre, polyphénols, minéraux et oligo-éléments entre l'épiderme et le fruit des variétés Gala, Fuji et Pink Lady d'après Henriquez <i>et al.</i> 2012 [35]	23
Tableau I-8 : Composition relative en polyphénols entre l'épiderme et le réceptacle charnu des pommes Gala et Pink Lady d'après McGhie <i>et al.</i> 2012 [36].....	24
Tableau I-9 : Caractérisation chimique des fibres pariétales de l'épiderme des pommes d'après Massiot <i>et al.</i> 1997 [26].....	24
Tableau I-10 : Phytosanitaires utilisés en 2011 dans les vergers de pommiers de Midi-Pyrénées	32-34
Tableau I-11 : Nombre moyen de traitements phytosanitaires appliqués sur les vergers de pommiers en France en 2011 d'après Agreste Primeur 2015 [54].....	38
Tableau I-12 : Répartition des IFT des pommiers dans le Tarn & Garonne en 2008 d'après consortium régional 2010 [55]	39
Tableau I-13 Liste des composés chimiques contenus dans les cires cuticulaires des végétaux d'après Bianchi 1995 [77].....	44
Tableau I-14 : Composés identifiés dans les cires solides et liquides des cuticules de pommes d'après Bianchi 1995 [77].....	45
Tableau I-15 : Triterpénoïdes identifiés dans les cires cuticulaires de pommes	46
Tableau I-16 : Composition chimique des cires épicuticulaires extraites à l'hexane de trois variétés de pommes d'après Verardo <i>et al.</i> 2003 [83].....	49

Tableau I-17 : Structures des principales classes de triterpénoïdes pentacycliques identifiés dans les cires de pommes d'après Grigoras 2012 [92].....	50
Tableau I-18 : Méthodes d'isolement de la cuticule	61
Tableau I-19 : Relation entre angle de goutte (eau) et nature des composés chimiques des cires cuticulaires d'après Holloway 1969 [129]	66
Tableau I-20 : Analyse de la composition chimique et des variations de transition vitreuse par DSC de sept extraits d'épiderme de pommes d'après Chen <i>et al.</i> 2008 [73]	84
Tableau I-21 : Exemples d'études de dégradation des molécules de phytosanitaires dans les pommes	91
Tableau I-22 : Evolution de la réglementation en matière de phytosanitaires en France et en Europe au XX ^e siècle (1/3) d'après Bonnefoy 2012 [37]	93-95
Tableau I-23 : Gain de la masse tandem par rapport à la masse simple dans le couplage avec le chromatographie en phase gazeuse pour l'analyse des pesticides d'après El Mrabet 2008 [218]	111
Tableau I-24 : Modes d'ionisation et nature des phytosanitaires d'après Raina 2011 [217] et El Mrabet 2008 [218]	112
Tableau I-25 : Comparaison CPG vs CLHP et nature des détecteurs d'après Cserhati et Szogyi 2012 [213]	115

Annexes :

Tableau I-a : Propriétés physico-chimiques et usages agricoles du boscalid, captane, carbendazime et chlorpyrifos-éthyl.....	142
Tableau I-b : Rémanence et métabolites de dégradation du boscalid, captane, carbendazime et chlorpyrifos-éthyl	143
Tableau I-c : Propriétés physico-chimiques et usages agricoles du dithianon, flonicamid, fludioxonil et propargite.....	144
Tableau I-d : Rémanence et métabolites de dégradation du dithianon, flonicamid, fludioxonil et propargite.....	145
Tableau I-e : Propriétés physico-chimiques et usages agricoles de la pyraclostrobine, pyrimicarbe, thiaclopride et thiamethoxam.....	146
Tableau I-f : Rémanence et métabolites de dégradation de la pyraclostrobine, pyrimicarbe, thiaclopride et thiamethoxam.....	147

Chapitre II

Tableau II-1 : Caractéristiques des variétés de pommes.....	154
Tableau II-2 : Echantillonnage des épidermes de pommes pour caractérisations.....	154
Tableau II-3 : Résultats des caractérisations chimiques des épidermes des trois variétés de pommes étudiées.....	169
Tableau II-4 : Identification par IRTF des groupes fonctionnels majoritaires des molécules constituant les cires totales des épidermes des trois variétés de pommes Gala (VAR1), Fuji (VAR2) et Pink Lady (VAR3)	174
Tableau II-5 : Comparaison des profils IR des lipides cuticulaires de l'épiderme de pommes Fuji (VAR2)	175
Tableau II-6 : Rendements d'extraction des cires totales des cuticules (Variétés 1, 2 et 3)	182
Tableau II-7 : Teneurs moyennes en composés triterpéniques identifiés dans les cires totales des épidermes des pommes (Variétés 1,2 et 3).....	185
Tableau II-8 : Répartition des acides oléanolique et ursolique dans les cires cuticulaires totales des épidermes de pommes (Variétés 1, 2 et 3).	186
Tableau II-9 : Teneur en hydrocarbures aliphatiques identifiés (C5-C40) dans les cires totales des épidermes des pommes (Variétés 1, 2 et 3). Légende : Tr =traces.	186
Tableau II-10 : Relation entre structure des cristaux de cires épicuticulaires, angle de goutte et composition chimique des cires des épidermes de pommes (Variétés 1, 2 et 3)	187
Tableau II-11 : Evaluation des rendements en cires des trois séries d'extraits par immersion dans des solvants de pommes entières (Variétés 1, 2 et 3)	196
Tableau II-12 : Teneurs moyennes en hydrocarbures aliphatiques, triterpénoïdes et esters des extraits de cires dans l'hexane (Variétés 1, 2 et 3).	199
Tableau II-13 : Teneurs moyennes en triterpénoïdes des extraits de cires dans le chloroforme (Variétés 1, 2 et 3)	202
Tableau II-14 : Teneurs moyennes en glucides libres et en anthocyanes totales des extraits de cires dans le méthanol (Variétés 1, 2 et 3)	204
Tableau II-15 : Bilan des rendements d'extraction des cires totales et des fractions extraites par immersion des pommes dans les solvants (variétés 1, 2 et 3)	205
Tableau II-16 : Bilans matières des cires totales et des fractions solvants	205
Tableau II-17 : Evaluation des ratios des structures amorphes et cristallines dans les lipides cuticulaires des épidermes de pommes (Variétés 1, 2 et 3).	210

Tableau II-18 : Transitions thermodynamiques mesurées par DSC TOPEM des lipides cuticulaires des épidermes de pommes (Variétés 1, 2 et 3)	212
Tableau II-19 : Grandeurs dynamiques du fludioxonil sorbé dans les cuticules entières, décirées et les cires totales de pommes (Variété 2)	229
Tableau II-20 : Bilan récapitulatif des caractérisations physico-chimiques et structurales des épidermes de pommes (Variétés 1, 2 et 3)	233

Chapitre III

Table III-1: Characteristics of target pesticides	248
Table III-2: Retention times (t_R) and MS/MS conditions	251
Table III-3: Pesticides and matrix compounds studied.....	269

Appendix. Supplementary data

Table A.1: Analytical parameters for the characterization of matrix compounds and the quantification of terpenoids in QuEChERS extracts by HPTLC/UV-Visible.....	285
Table A.2: Matrix effect values evaluated without normalization of chromatographic peak area (from previous study by Giacinti <i>et al.</i> 2016 [42]).....	285
Table A.3: Pearson correlation coefficients between matrix effects and matrix compounds M _{Ci} levels (areas of peaks) measured in the nine studied apple extracts	286

Chapitre IV

Tableau IV-1 : Sélection des 11 phytosanitaires identifiés dans les pommes du Sud-Ouest de la France.....	304
Tableau IV-2 : Sélection des supports adsorbants solides	305
Tableau IV-3 : Ratios support adsorbant solide / phytosanitaires	305
Tableau IV-4 : Présentation des formulations commerciales et compositions massiques théoriques et expérimentales des molécules actives	306
Tableau IV-5 : Paramètres de CPG/DIF.....	308
Tableau IV-6 : Sélection des supports adsorbants liquides filmogènes	308
Tableau IV-7 : Formulations des supports filmogènes	309
Tableau IV-8 : Préparation des solutions aqueuses de phytosanitaires pour contamination.....	310
Tableau IV-9 : Résumé des essais de décontamination des pomme (Variété 2).....	311
Tableau IV-10 : Paramètres pour l'analyse quantitative des phytosanitaires par CPG/DIF	312

Tableau IV-11 : Limites de détection et de quantification évaluées pour les différentes méthodes analytiques utilisées dans les travaux	313
Tableau IV-12 : Déviations standards relatives calculées pour les teneurs moyennes en boscalid et pyraclostrobine mesurées dans des pommes (variété 2), 24 heures et 10 jours après contamination par Bellis	314
Tableau IV-13 : Sélection des agents de vectorisation	314
Tableau IV-14 : Taux de recouvrement moyens des molécules de phytosanitaires par extraction solide-liquide	316
Tableau IV-15 : Liste des additifs alimentaires pour les formulations de décontamination.	317
Tableau IV-16 : Décontamination des pommes par immersion.....	318
Tableau IV-17 : Décontaminations des pommes par moitié par application avec action mécanique	319
Tableau IV-18 : Préparation de la solution aqueuse de phytosanitaires pour contamination.....	322
Tableau IV-19 : Formulations pour essais de décontamination des pommes sur pilote laboratoire (Variété 2).....	323
Tableau IV-20 : Paramètres de quantification des phytosanitaires par CPG/SM en mode SIM.....	324
Tableau IV-21 : Essais pour la mise au point du procédé industriel de décontamination des pommes en station fruitière	325-326
Tableau IV-22 : Résultats des essais préliminaires de décontamination des pommes (Variété 2)	336
Tableau IV-23 : Evaluation par CPG/SM des teneurs en boscalid et en pyraclostrobine dans l'épiderme des pommes en sortie de conditionnement (Variété 2) avant et après traitement par pectines	341
Tableau IV-24 : Teneurs en phytosanitaires évaluées dans les épidermes de pommes après décontamination en batch de 15 minutes (Variétés 1,2 et 3).....	352
Tableau IV-25 : Evaluation de l'efficacité des plastifiants en fonction de différents paramètres physico-chimiques dont les HSP	357
Tableau IV-26 : Taux d'extraction des phytosanitaires dans les épidermes de pommes (Variétés 2 et 3) par la triacétine E1518	359
Tableau IV-27 : Résidus phytosanitaires dans les pommes après décontamination en batch de 4 minutes sans brossage (Variété 2)	360
Tableau IV-28 : Grandeurs dynamiques du fludioxonil sorbé à 0,14 % dans les cuticules entières obtenues après lyse enzymatique d'épidermes de pommes (Variété 2), avant et après extraction par des plastifiants et rinçage	362

Tableau IV-29 : Propriétés physico-chimiques des additifs et solvants sélectionnés pour les essais sur pilote industriel	375
Tableau IV-30 : Teneurs en phytosanitaires des pommes après traitement sur pilote industriel (Variété 2).....	378-379
Tableau IV-31 : Caractéristiques des formules A, B, C et D et des solvants purs	380
Tableau IV-32 : Classement des formules A, B, C et D selon leur efficacité théorique et réelle	380
Tableau IV-33 : Caractéristiques physico-chimiques des plastifiants.....	386

Annexes :

Annexe 1 : Variabilité des témoins de contamination des épidermes de pommes Fuji (variété 2) par le boscalid et la pyraclostrobine.....	394
Annexe 2 : Résultats des essais d'extraction sur supports adsorbants solides du chlorpyrifos-Et / Pyrinex à 500 ng/μL dans l'eau.....	395
Annexe 3 : Résultats des essais d'extraction sur supports adsorbants solides du chlorpyrifos-Et / Pyrinex à 0,5 ng/μL dans l'eau.....	395
Annexe 4 : Résultats des essais d'extraction sur supports adsorbants solides du chlorpyrifos-Et / Pyrinex à 10 ng/μL dans l'eau.....	396
Annexe 5 : Résultats des essais d'extraction sur supports adsorbants solides du fludioxonil / Geoxe à 400 ng/μL dans l'eau.....	396
Annexe 6 : Résultats des essais d'extraction sur supports adsorbants solides du flonicamid / Teppeki à 140 ng/μL dans l'eau.....	397
Annexe 7 : Résultats des essais d'extraction sur supports adsorbants solides du boscalid et de la pyraclostrobine / Bellis à 800 ng/μL dans l'eau	397
Annexe 8 : Teneurs résiduelles en boscalid et en pyraclostrobine dans les épidermes de pommes (variété 2) après application des solutions de décontamination à base de supports adsorbants liquides filmogènes 24 heures après la contamination par Bellis	398
Annexe 9 : Teneurs résiduelles en boscalid et en pyraclostrobine dans les épidermes de pommes (variété 2) après application des solutions de décontamination à base de supports adsorbants liquides filmogènes 10 jours après la contamination par Bellis.....	399
Annexe 10 : Teneurs en chlorpyrifos-éthyl évaluées par CPG/DIF dans des épidermes de pomme Gala (Variété 1) contaminées par Pyrinex (0,5 g/L) avant et après décontamination par des agents filmogènes à base de gomme arabique.....	399
Annexe 11 : Taux d'extraction des résidus phytosanitaires dans les cires reconstituées des cuticules des pommes de la variété 2 par des systèmes organisés lipophiles (agents de vectorisation)	400

Annexe 12 : Taux d'extraction du fludioxonil dans les épidermes de pommes de la variété 2 après décontamination en batch.....	401
Annexe 13 : Paramètres de solubilité de Hansen des molécules de phytosanitaires et d'additifs et des formulations.....	402
Annexe 14 : Résultats des essais de décontamination des pommes de la variété 2 sur pilote laboratoire	403

Introduction générale

La pomme sauvage serait apparue il y a environ 60 millions d'années, en Europe et au Proche-Orient, durant les ères du Néolithique et de l'Age de Bronze. Les premières cultures de la pomme domestique datent de 3000 à 4000 ans. De nos jours, c'est le troisième fruit le plus consommé dans le monde, après l'orange et la banane. Elle doit sans doute son succès à ses nombreuses qualités. Sa culture est assez répandue : la plupart des continents en produisent (Europe, Asie, Océanie - Nouvelle Zélande, Australie - Amérique). Ses variétés sont nombreuses et couvrent des qualités organoleptiques assez étendues pour en faire un fruit très populaire (plus ou moins acides, plus ou moins sucrées, croquantes, farineuses, rouges, vertes, bicolores, roses, différents calibres...). Elle est facile à emporter et à consommer avec pratiquement aucun déchet. Les prix restent abordables et pour les consommateurs particulièrement soucieux du bilan carbone, il existe toujours une variété proche de chez soi à acheter et à déguster. Parallèlement, la productivité et l'innovation ont eu un recours massif aux traitements chimiques. La généralisation au niveau mondial de l'usage des produits phytosanitaires correspond au développement agricole des 50 années suivant la fin de la seconde guerre mondiale. L'accroissement de la population et la mondialisation ont été à la base de la mise en place de systèmes de production intensifs : meilleurs rendements, maîtrise du risque sanitaire pour répondre aux besoins toujours croissants de la population. Globalement, entre 1945 et 1985, la consommation de produits phytosanitaires a été multipliée par 2 tous les 10 ans ! Les conséquences de cette utilisation excessive sont multiples : environnementales (rémanence dans les eaux et les sols, pollution de l'air, bioaccumulation...) et sanitaires (résistances chez certains organismes, troubles de la reproduction de certaines espèces, mortalité, déclin des prédateurs de la chaîne alimentaire, exposition aux risques des professions agricoles et des riverains...). Aujourd'hui, une régularisation très encadrée de l'usage des produits phytosanitaires de traitement a été engagée tant au niveau national par le Plan Ecophyto 2018 qu'europpéen par la Directive européenne 76/895/CE et le règlement N°1107/2009. L'objectif est clair : diminuer la quantité d'intrants en limitant le recours aux produits de traitements dans tous les secteurs, agricoles, industriels, publics, domestiques. Malheureusement, le Plan Ecophyto 2018 qui visait à diminuer de 50 % l'usage de ces produits entre 2008 et 2018 n'atteindra pas ses objectifs. Entre 2006 et 2011, en France, les indices de fréquence de traitements (IFT) de la plupart des cultures n'ont pas diminué significativement. Les cultures fruitières sont les plus traitées (IFT total moyen de 17,3 en 2006) devant la viticulture (IFT total moyen de 12,5 en 2006), les cultures maraîchères (IFT total moyen de 10 en 2006) et les grandes cultures (IFT total moyen de 3,8 en 2006). Parmi les cultures fruitières, la pomme, premier fruit du marché français avec 19,5 % des parts, constitue un enjeu économique de premier ordre (700 millions d'Euros en 2011). C'est le fruit le plus traité avec des indices pouvant s'élever jusqu'à 36 selon les variétés et les risques phytosanitaires encourus.

Les présents travaux s'inscrivent dans un projet global, le FUI – AAP13 INNO'POM – AGRIMIP 2012 (2012-2016) visant à organiser la lutte contre les infestations de nuisibles dans les vergers par des mesures préventives et/ou curatives alternatives ainsi qu'à diminuer le niveau de résidus dans les fruits au moment de leur commercialisation. L'objectif spécifique a consisté à mettre au point un procédé de décontamination par voie chimique, transposable au niveau industriel pour l'obtention de pommes avec « zéro résidu » détectable. Afin de mener à bien cette étude, trois variétés de pommes issues des vergers du Tarn-et-Garonne en Midi-Pyrénées - première région productrice du Sud-Ouest de la France, avec plus de 50% de la production régionale - ont été sélectionnées : Gala, Fuji et Pink Lady®. Douze

molécules de phytosanitaires, choisies parmi les plus représentatives pour le traitement des pommes du Tarn-et-Garonne (fréquence, risques...), ont été retenues : boscalid, captane, carbendazime, chlorpyrifos-éthyl, dithianon, flonicamid, fludioxonil, pirimicarbe, propargite, thiaclopride, thiamethoxam et pyraclostrobine.

Dans un premier chapitre, une étude de l'état de l'art sur la pomme, les intrants phytosanitaires et les méthodes d'extraction et d'analyse des résidus dans les denrées alimentaires est présentée. Concernant la pomme, les origines du fruit et quelques aspects botaniques sont abordés. La composition chimique du fruit et plus particulièrement de l'épiderme est développée. Une partie importante est consacrée au fractionnement de la cuticule, membrane complexe protégeant la face externe de l'épiderme, et à la caractérisation physico-chimique des lipides la composant. Le rôle de la cuticule est présenté et les deux voies de pénétration des solutés à travers l'épiderme sont opposés : voie de diffusion apolaire des solutés non chargés, lipophiles et de l'eau *via* les zones amorphes des cires cuticulaires, voie de diffusion polaire des solutés ioniques *via* les lenticelles et les microcraquelures. Quant aux intrants phytosanitaires, trois points essentiels sont présentés : (i) historique, formulation et IFT, (ii) mécanisme de pénétration dans l'épiderme et paramètres affectant cette pénétration puis localisation et métabolisation des molécules de phytosanitaires *in situ*, et (iii) réglementations française et européenne sur l'usage des produits de traitement et définition du terme « résidu phytosanitaire ». Enfin, dans le cadre du contrôle des résidus phytosanitaires dans les denrées alimentaires, les différentes méthodes d'extraction et d'analyse des résidus sont développées. Les effets matrice, inhérents au dosage des résidus à l'état de traces dans des matrices très complexes que sont les fruits, les légumes, les céréales et les produits transformés, sont évoqués.

Le second chapitre est consacré à la caractérisation physico-chimique et structurale des épidermes et des cuticules des trois variétés de pommes. Quatre voies de fractionnement des épidermes sont étudiées : (i) la lyophilisation des épidermes pour caractériser les matières minérales, les fibres (cellulose, hémicelluloses et lignines), les protéines, les sucres simples libres (glucose, fructose, saccharose, sorbitol), les acides organiques (acides malique et citrique) et les pectines, (ii) la lyse enzymatique des épidermes pour déterminer la teneur en lipides (cires solubles, cutine et cutane), (iii) les extractions mécaniques sélectives des cires épicuticulaires, et (iv) les extractions successives par immersion des fruits entiers dans trois solvants de polarité croissante pour déterminer la composition chimique des cires cuticulaires. Les différentes structures (amorphe, cristalline, mobile, solide...) des cuticules isolées par voie enzymatique, les cires totales extraites et les cuticules décirées sont analysées par diffraction des rayons X, analyse calorimétrique différentielle à balayage (DSC), par RMN du ¹³C solide et par microscopie électronique à balayage (MEB). Enfin, pour mettre en évidence les interactions entre phytosanitaire et composés de la cuticule, une étude de la dynamique du fludioxonil dans la cuticule des pommes Fuji par RMN du ¹⁹F solide est présentée.

Dans le troisième chapitre, les techniques analytiques sont abordées au travers de l'étude des résidus de molécules phytosanitaires dans l'épiderme, la chair et la pomme entière des trois variétés de pommes. Dans le cadre du contrôle sanitaire des résidus, les limites maximales autorisées pour l'alimentation humaine et animale sont régies par le règlement N°396/2005/CE ; elles sont régulièrement révisées. La détection et la quantification des résidus représentent un véritable enjeu technologique mais aussi de santé publique. Les limites toujours plus basses imposées par la communauté européenne, sous l'influence de l'opinion publique en quête du zéro résidu, nécessitent des appareils toujours plus sensibles, sélectifs et spécifiques. Différents arrêtés fixent les méthodes analytiques des résidus dans des matrices aussi diverses que complexes. L'analyse de traces est toujours

délicate, de par les quantités infimes à extraire et à doser, mais aussi de par la composition de la matrice de laquelle ils doivent être séparés. Il est courant qu'au moment de l'extraction, des analytes intrinsèques à la matrice sont également dissous dans les solvants. Ils interfèrent plus ou moins à chaque étape de la préparation des échantillons et lorsqu'ils ne peuvent pas être séparés, ils interfèrent au moment de l'analyse (injection, détection). Les interférences sont d'autant plus marquées que le niveau de résidus est faible, de l'ordre de l'ultratrace. Elles représentent un verrou scientifique et technologique en terme de quantification, avec la surestimation ou la sous-estimation des teneurs en résidus phytosanitaires. Les effets matrices étaient encore peu connus il y a 15 ans ; aujourd'hui, ils sont totalement admis et inhérents au dosage des résidus phytosanitaires dans les matrices alimentaires. L'analyse des résidus fait partie intégrante de l'évaluation de l'efficacité des formulations de décontamination et plus largement du procédé. Dans ce sens, une part importante lui a été consacrée dans ces travaux. Dans le chapitre II, les travaux mettent en relation les effets matrice observés lors des analyses de résidus par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse trappe d'ions (CPG/SM²) et la composition chimique de la matrice. Ces effets matrice pourraient être le reflet d'une forte interaction entre les résidus phytosanitaires et certains composés de la cuticule, qui peut également contribuer à expliquer les difficultés d'extraction des résidus.

Enfin, le chapitre IV est dévolu à l'étude d'un procédé industrialisable de décontamination par voie chimique des pommes avant leur commercialisation. Dans un premier temps, afin d'identifier le procédé conduisant à un « zéro résidu » détectable, trois séries de supports adsorbants ont été évalués en terme d'efficacité d'extraction des molécules de phytosanitaires : (i) des supports adsorbants solides agissant en phase aqueuse, (ii) des supports adsorbants filmogènes agissant à la surface des pommes, (iii) des systèmes organisés agissant comme plastifiants au cœur de la cuticule. Dans un second temps, la mise au point d'une formule de décontamination a permis d'étudier les interactions plastifiants – phytosanitaires – cuticule dans les épidermes des pommes Fuji. En particulier, l'effet des plastifiants a été étudié sur la mobilité du fludioxonil dans les cuticules des pommes par RMN du ¹⁹F solide et sur la structure de la cuticule par RMN du ¹³C solide. Enfin, la sélection des meilleurs agents de décontamination a été mise en œuvre sur un pilote préindustriel installé sur la station fruitière de Quercy Soleil, à Moissac, dans le Tarn-et-Garonne. Ce pilote est détaillé, ainsi que les critères de sélection des agents et des pommes testées. Les différents paramètres variables visant à optimiser le rendement d'extraction des molécules de phytosanitaires sont présentés. Les résultats des différents essais effectués sont discutés et un schéma de désorption des résidus dans la cuticule dans l'objectif d'un « zéro résidu » détectable est proposé.

CHAPITRE I

Etat de l'art bibliographique



Malus de Sibirie

P. B. 24

Malus Malo

1794

Chapitre I Etat de l'art bibliographique

1. La pomme, *Malus domestica* sp.

1. 1. La pomme et les Français

La pomme est le troisième fruit le plus consommé dans le monde après les agrumes et la banane (France Agroalimentaire 2011 [1]). La production annuelle mondiale représente près de 71 millions de tonnes par an (53 % par la Chine) dont 11,9 en Europe : respectivement la Pologne, l'Italie et la France cumulent 62 % de la production européenne. La France produit annuellement environ 1,5 millions de tonnes de pommes (1,67 millions en 2011 et 1,49 millions en 2014) (France AgriMer 2015 [2]).

En 2014/15, l'Europe est la principale source d'exportation avec 66 % des tonnages exportés. La France a exporté 578.326 tonnes, principalement en Europe (383.789 T) vers le Royaume Uni (114.892 T), l'Espagne (81.743 T), l'Allemagne (45.280 T) et les Pays-Bas (38.183 T), mais également vers l'Afrique du Nord (80.542 T) et le Moyen-Orient (65.040 T) (France AgriMer 2015 [3]).

La pomme est le fruit préféré des Français (France Agroalimentaire 2011 [1]) : 19,5 % des parts de marché Fruits et Légumes (soit 450.000 tonnes par an), contre 13,3 % pour la banane et 13,2 % pour l'orange. La consommation moyenne annuelle est de 20 kg par foyer et est fonction de l'âge des consommateurs :

- moins de 10,5 kg/an pour les moins de 35 ans,
- plus de 22 kg/an pour les plus de 50 ans.

La France ne se trouve qu'en 7^e position après la Danemark (> 50 kg/habitant), les Pays-Bas, l'Autriche, la Grèce, la Belgique et le Portugal (Ageste 2011 [4]). Elle est consommée plutôt fraîche (12 kg/habitant) que transformée (8 kg/habitant). Neuf Français sur dix achètent des pommes au moins une fois par an. Le marché national français de la pomme s'élevait à 700 millions d'Euros en 2011. La France a produit 575.000 tonnes de Golden Delicious (466.000 T en 2014), 263.000 tonnes de Gala, 192.000 tonnes de Granny Smith (143.000 T en 2014) ainsi qu'une dizaine d'autres variétés (Pink Lady, Elstar...) (France Agroalimentaire 2011 [1], France AgriMer 2015 [2]).

En 2014, l'embargo russe a fortement pénalisé la production française de pommes. La Pologne qui a l'habitude d'exporter en Russie se voit contrainte d'écouler ses stocks vers les autres marchés du grand export. La Golden et la Granny d'Italie concurrencent les exportations françaises en Europe et dans le monde. A cela s'ajoute une hausse de 12 % de la production européenne par rapport aux trois dernières années. Face à ces difficultés, la Commission Européenne lance un plan d'aide exceptionnel et de multiples campagnes de communication (INTERFEL et ANPP) inondent le marché français et européen (France AgriMer 2015 [2]).

Combien existe-t-il de variétés de pommes ? Plusieurs centaines au minimum (Figure I-1) ! Mais le nombre exact paraît inaccessible. Une étude des ressources génétiques du pommier, établie sur quatorze bases de données et consultable sur le site internet www.pomologie.com a recensé 11.324 variétés de pommes existantes à ce jour dans le monde, dont plus de 95 % sont classées sous le genre *domestica*.



Figure I-1 : Table variétale des pommes en France [5]

En 2012/13, les principales régions productrices sont au nombre de trois (Figure I-2) :

- les trois régions du Sud-Est avec 36 % de la production française,
- le Sud-Ouest (Aquitaine + Midi-Pyrénées) avec 24 %,
- le Pays de Loire avec 15 %.

Au total, 8000 exploitations se partagent 45000 ha de vergers.

Dans le Sud-Ouest, Midi-Pyrénées est la première région productrice avec plus de 50 % de la production régionale (276.510 T en 2013, 329.438 T en 2015 pour Midi-Pyrénées-Languedoc Roussillon - Chambre d'Agriculture Midi-Pyrénées-Languedoc Roussillon 2015 [6]). En 2012, la production de pommes est majoritaire devant celles des prunes, des noix, des kiwis, des cerises et des pêches respectivement (Agreste 2012 [7]).

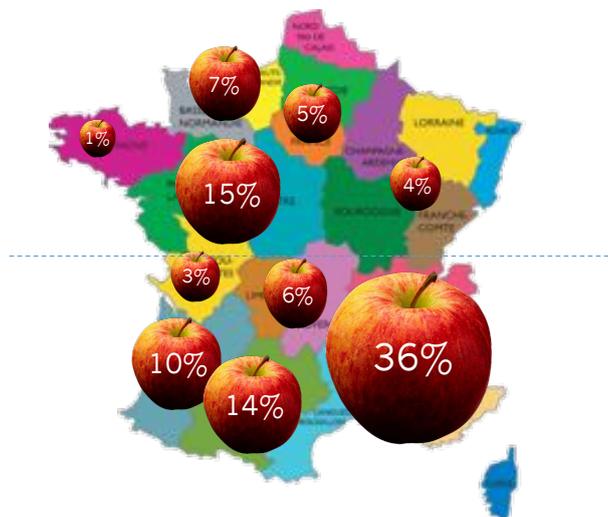


Figure I-2 : Répartition de la production de pommes de table en France (Agreste 2012 [7])

Parmi les 11.324 variétés existantes, la région Midi-Pyrénées cultive une dizaine de groupes variétaux (Tableau I-1).

Groupes variétaux	%
Gala	26
Golden	18
Granny	12
Fuji	11
Braeburn	10
Reinettes diverses	9
Rouges américaines	5
Pink Lady	4
Autres	3
Résistantes à la tavelure	3

Tableau I-1 : Répartition de la superficie de pommiers par variété en Midi-Pyrénées en 2007 (Agreste 2008 [8])

1. 2. Origines et botanique

Le pommier est issu du croisement entre deux espèces de la famille des Rosacées, le prunier primitif *Prunus sp.* et la Reine des prés *Filipendula sp.* D'après l'étude de pollen fossiles, la pomme est apparue il y a environ 60 millions d'années (Ziadi 2001 [9]). Les premiers témoignages rapportant l'existence de la pomme remontent au Néolithique et à l'Age de Bronze, en Europe et au Proche-Orient (Van 2011 [10]).

L'origine de la domestication de la pomme est assez floue (Robinson *et al.* 2001 [11]). Il en va de même pour l'origine botanique des espèces sauvages ayant conduit au pommier domestique. Il est possible que les premières pommes comestibles soient originaires du Moyen-Orient (Vavilov 1930 [12]), dans les environs de la Mer Noire et de la Mer Caspienne (Ziadi 2001 [9]). Dès 1930, Vavilov assure que *M. sieversii* et ses semblables sont les ancêtres de *M. domestica*. Les premières pommes domestiques seraient donc apparues il y a 4000 ans au Moyen-Orient, à une époque où la technique de greffage commençait à se répandre. Au départ, les cultivars de pommes ont été probablement le résultat d'une pollinisation ouverte mais c'est surtout l'invention ou la découverte du greffage qui a été déterminante pour le développement de *M. domestica*. Depuis le Moyen-Orient, les pommes domestiques ont traversé les continents et sont arrivées jusque chez les Grecs et les Romains qui se chargèrent d'étendre leur culture à toute l'Europe (Van 2011 [10], Robinson *et al.* 2001 [11]).

Plusieurs espèces asiatiques (*M. asiatica*, *M. baccata*, *M. micromalus*, *M. orientalis*, *M. prunifolia* et *M. sieversii*) et européennes (*M. sylvestris*) sont les plus proches de *M. domestica* sur un plan taxonomique (Robinson *et al.* 2001 [11]). Elles peuvent avoir contribué, à différents niveaux, au génome commun de *M. domestica*. En 2010, le génome complet de *M. domestica* (Golden Delicious) est publié par un consortium international de 85 scientifiques sous la direction des Italiens de l'Institut Agraire de San Michele all'Adige après deux années de recherche et de séquençage (Velasco *et al.* 2010 [13]). Cette importante découverte confirme que la pomme domestique est cultivée depuis 3000 à 4000 ans dont l'ancêtre, *Malus sieversii*, est encore très répandu dans les forêts du Kazakhstan et de Chine. A l'image de nombreuses autres espèces, les pommes seraient susceptibles d'avoir dupliqué leur génome il y a environ 50 à 65 millions d'années pour survivre à la période hostile de l'extinction de l'ère Crétacé tertiaire (Fawcett *et al.* 2009 [14]).

Le pommier appartient à la famille des Rosacées dont la taxonomie n'est pas encore totalement fixée (Potter *et al.* 2007 [15]) et au genre *Malus* (Tableau I-2). Ce genre comporte 25 à 47 espèces et plusieurs sous-espèces (Robinson *et al.* 2009 [11]).

Nom commun	Pommier
Espèce	<i>Malus domestica</i>
Genre	<i>Malus</i>
Sous-famille	<i>Maloïdeae</i>
Famille	Rosacées
Ordre	Rosales
Sous-classe	Dialypétales
Classe	Dicotylédones
Sous-embranchement	Angiospermes
Embranchement	Spermaphytes

Tableau I-2 : Taxonomie de la pomme domestique d'après Ziadi 2001 [9]

La pomme Gala qui est une des plus populaires auprès des Français (Tableau I-1) a été développée par J. H. Kidd en 1920, en Nouvelle-Zélande. Elle est issue du croisement de deux variétés : la Kidd's Orange Red et la Golden Delicious. Il existe de nombreuses mutantes sélectionnées pour leur couleur rouge (Ex. Royal Gala). La pomme Fuji, en 4^e position a été créée au Japon en 1939 par le Centre de Recherche et en Horticulture de Morioka et cultivée à Fujisaki, puis exportée en 1962 par le Centre de Recherche en Horticulture de Tohoku. Elle est issue du croisement de la Ralls Janet et de la Red Delicious. Au rang 8, la Pink Lady est une sélection des meilleurs fruits du cultivar Cripps Pink, créé en 1973 par John Cripps, alors *Chief Executive Officier* du *Department of Agriculture Western Australia de Apple and Pear Australia Limited*, à Stoneville, Australie. Elle est arrivée en France en 1995. Elle est issue du croisement de Golden Delicious et de Lady Williams.

1. 3. De l'arbre au fruit : les aspects biologiques

Le pommier est un arbre au port arrondi qui peut atteindre 6 à 10 m de haut. Les rameaux sont caractérisés par une écorce brune, lisse, à nombreuses radicelles et devenant rugueuse avec l'âge.

Les feuilles (Figure I-3) sont caduques, alternes, simples, entières, dentées sur les bords, velues à l'état juvénile et munies d'un pétiole plutôt court. Le pétiole est accompagné de deux stipules foliacés à sa base.



Figure I-3 : Feuilles de pommier Smoothie (Ecolothèque de Montpellier)

1. 3. 1. L'appareil reproducteur et la pollinisation

Les fleurs sont composées de 5 pétales (A, N°3), 5 sépales (A, N°2), d'étamines (A, N°1) et de 5 carpelles (A, N°4-6) (Figure I-4). Le carpelle est composé du stigmate (A, N°4), du style (a, N°5) et de l'ovaire (A, N°6) dans lequel se trouve la loge (A, N°13) où niche une à deux graine(s) (A, N°14). L'ensemble des 5 carpelles forme l'organe femelle, appelé gynécée ou pistil. Dans le cas de la fleur de pommier, les cinq carpelles sont fermés et soudés : il y a union totale des ovaires et partielle des styles. Le gynécée est alors dit syncarpe. L'ovaire est situé sous la fleur : il est infère épigyne et adhérent au réceptacle (A, N°11). La placentation est dite axile : le placenta se trouve dans la partie axiale de l'ovaire, dans l'angle interne de chaque loge (A, N°13). Les étamines (A, N°1) constituent l'organe reproducteur mâle (Prat 2010 [16], Bowes 2012 [17]).

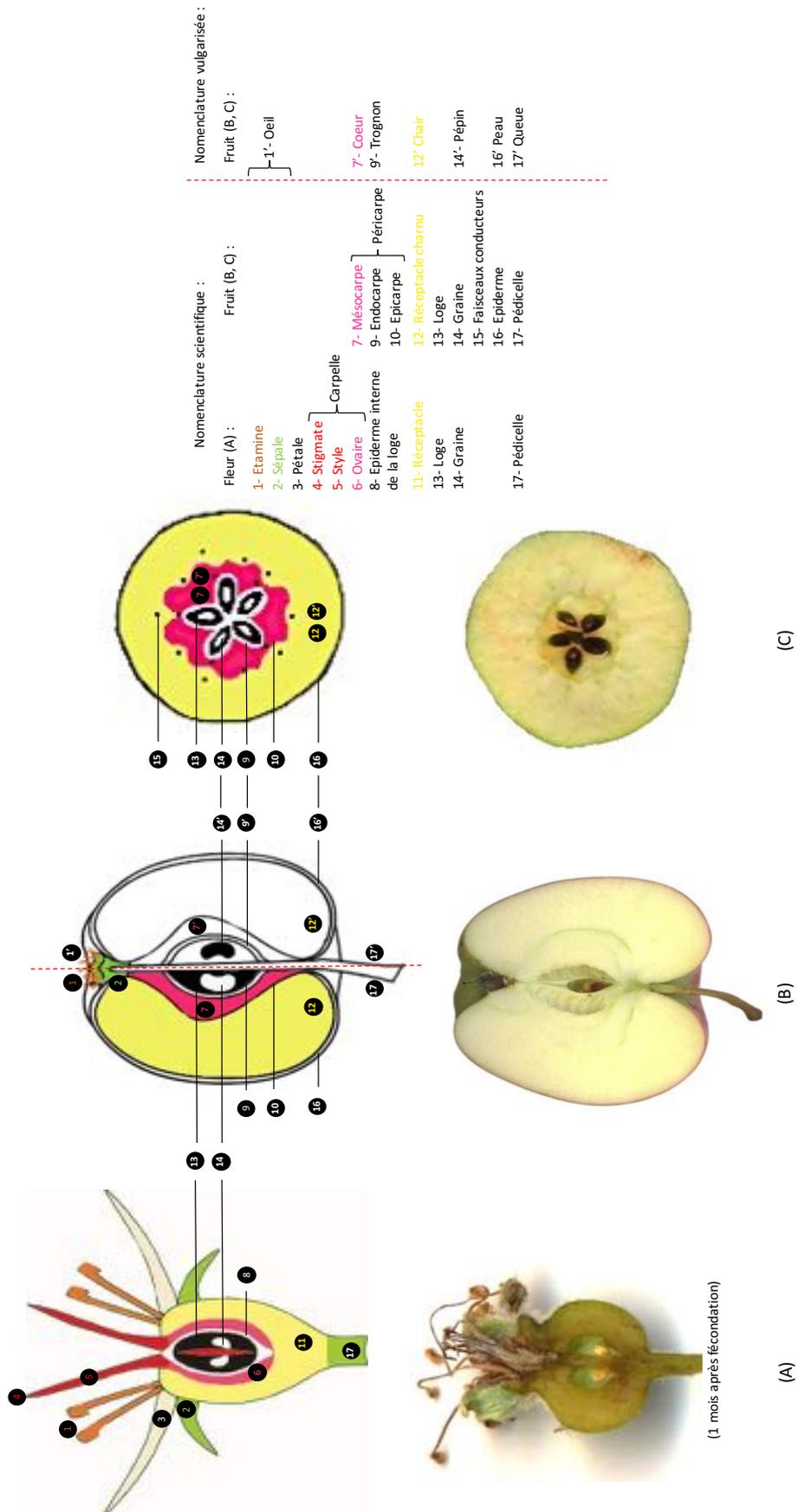


Figure I-4 : Appareil reproducteur de la fleur de pommier (A) et anatomie du fruit en coupes longitudinale (B) et transversale (C) d'après Prat 2010 [16] et Bowes 2012 [17]

Bien que certaines variétés aient été rendues auto-fertiles (Braeburn, Golden Delicious, Granny Smith, Jonared...), le régime de fécondation du pommier est allogamique car il présente une auto incompatibilité pollinique de type gamétophytique : son pollen ne peut pas féconder les pistils de sa propre variété. Ceci implique nécessairement la plantation en verger ou le greffage sur l'arbre d'un rameau de variétés pollinisatrices compatibles qui fleurissent en même temps, permettant ainsi aux insectes butineurs de transporter le pollen des espèces pollinisatrices sur les pistils des espèces cultivées (Ziadi 2001 [9]).

Après la pollinisation (transport de pollen des étamines des variétés pollinisatrices vers les stigmates des fleurs des variétés cultivées, germination du pollen sur le stigmate et fécondation de l'ovule qui se transforme alors en graine), commence la nouaison (Figure I-5) qui correspond à la phase initiale de la formation du fruit sur l'arbre.

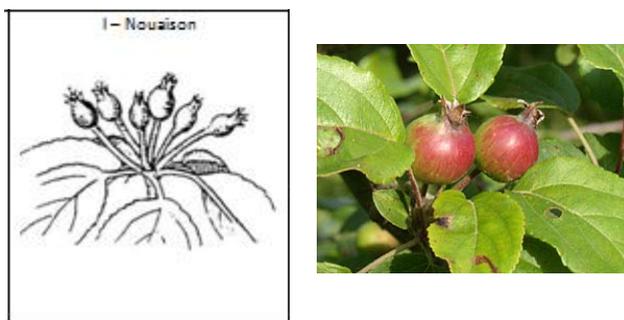


Figure I-5 : Phase de nouaison (d'après C. Minost, Stades phénologiques du pommier, sur www7.inra.fr, consulté le 31 Janvier 2016)

1. 3. 2. Le développement anatomique du fruit

La croissance du fruit s'organise selon 4 grandes phases (Colin-Henrion 2008 [18]) :

- la première est la phase de différenciation cellulaire et de diversification tissulaire. Elle conduit à la formation des principaux organes du fruit (Figure I-4),
- s'ensuit la phase de floraison durant laquelle la croissance des tissus est stoppée,
- la troisième phase correspond à l'accumulation des substances de réserves (amidon et acides organiques),
- enfin, arrive la maturation au cours de laquelle intervient un grand nombre de modifications biochimiques et physiologiques conférant au fruit ses principales propriétés organoleptiques (couleur, arômes, jutosité...),
- au-delà, survient la sénescence qui correspond à la dégradation cellulaire et à la mort du fruit.

Dans le cas des fruits simples, le fruit naît du développement de la paroi de l'ovaire. Dans le cas des fruits complexes (piridions), la formation du fruit fait intervenir d'autres tissus que la simple paroi de l'ovaire. Lorsque le développement du fruit se fait à partir d'une fleur à ovaire infère et adhérent au réceptacle, le fruit se compose du réceptacle devenu charnu et soudé à l'ovaire. C'est le cas de la pomme (Prat 2010 [16], Bowes 2012 [17]). Le réceptacle charnu (B et C, N°12), communément appelé chair (B et C, N°12') est donc constitué par le développement hypertrophié du réceptacle de la fleur (A, N°11). Les parois de l'ovaire (A, N°6) se développent partiellement pour former le

mésocarpe (B et C, N°7), c'est-à-dire le cœur du fruit (B et C, N°7'). L'épicarpe (B et C, N°10) est la ligne fine visible sur le fruit en coupes qui marque la séparation entre le mésocarpe (B et C, N°7) et le réceptacle charnu (B et C, N°12). Les épidermes internes (A, N°8) des loges (A, B et C, N°13) se lignifient et constituent l'endocarpe (B et C, N°9), communément dénommé trognon (B et C, N°9'). L'ensemble de l'épicarpe, du mésocarpe et de l'endocarpe constitue le péricarpe. Les loges protègent les graines (A, B et C, N°14) ou pépins (B et C, N°14'). Le réceptacle et le mésocarpe sont traversés longitudinalement par les faisceaux conducteurs (C, N°15) qui irriguaient les sépales (A, N°2) et les pétales (A, N°3) des fleurs. Il est protégé à sa surface la plus externe par une membrane appelée épiderme (B et C, N°16), usuellement dénommée peau (B et C, N°16'). Dans le cas des pommes notamment, l'épiderme est cutinisé, c'est-à-dire recouvert d'une couche de lipides protectrice appelée cuticule, qui n'est pas une assise de cellules. A une extrémité, le pédicelle (A, B et C, N°17) constitue la queue (B et C, N°17') du fruit. L'autre extrémité ou œil du fruit (B, N°1') regroupe les réminiscences des étamines (A, N°1) et des sépales (A, N°2) de la fleur.

La pomme est un fruit climactérique. En effet, elle est sensible à l'éthylène, une phytohormone responsable de la maturation des fruits. Sa maturation est associée à une forte augmentation de la respiration cellulaire des tissus (Figure I-6) qui est liée à la dégradation oxydative des acides organiques présents dans le fruit et s'accompagne donc d'une baisse de l'acidité du fruit. De même, l'amidon, présent en quantité importante dans le fruit immature, est hydrolysé en glucides solubles (glucose et maltose) participant à la saveur du fruit. Au niveau des parois cellulaires, on constate une diminution de l'adhésion cellulaire. Les substances pectiques constituant la lamelle moyenne des parois sont solubilisées au cours de la maturation, probablement sous l'action de certaines enzymes, entre autres polygalacturonase et pectine méthylestérase. Cette solubilisation s'accompagne du ramollissement du fruit. Une fois récoltée, la pomme présente une autonomie de maturation grâce à une synthèse autocatalytique d'éthylène. La récolte agit comme un stress sur le fruit et tend à accélérer le pic climactérique (augmentation d'éthylène = hormone de stress) et donc sa maturation (Puech 2002). En post récolte, les fruits augmentent leur production d'éthylène et leur fermeté diminue inéluctablement. Les blessures et les attaques fongiques en stimulant la synthèse de l'éthylène par le fruit, contribuent à la maturation et accélère la survenue de la sénescence. Pour assurer une conservation optimale de la pomme en post récolte, les fruits sont récoltés juste avant le pic climactérique et sont stockés dans des chambres à atmosphère contrôlée. Les échanges gazeux (éthylène, O₂, CO₂...) et la température y sont suivis et maîtrisés. Le fruit est ainsi mis en dormance pendant plusieurs mois (Colin-Henrion 2008 [18]).

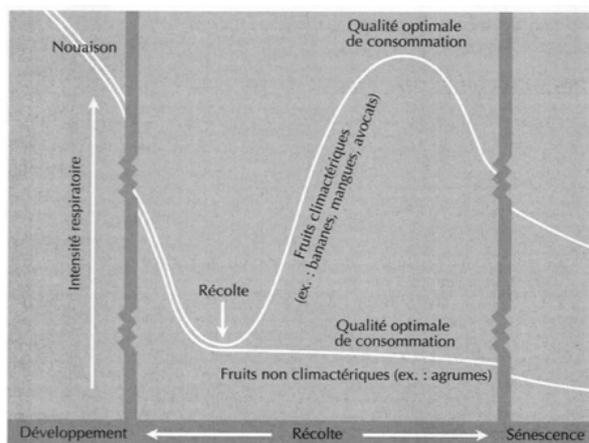


Figure I-6 : Cycles des fruits climactériques et non climactériques (Laville 1994 [19])

1. 4. Cytologie et histologie végétales

1. 4. 1. La cellule végétale et la paroi cellulaire

La cellule végétale (Figure I-7) est constituée d'un noyau (N°1) et d'un cytosquelette (N°9). Elle contient des plastes (N°13), des pigments assimilateurs (chlorophylle, caroténoïdes) et des vacuoles (N°8) qui occupent 80 à 90 % du volume cellulaire.

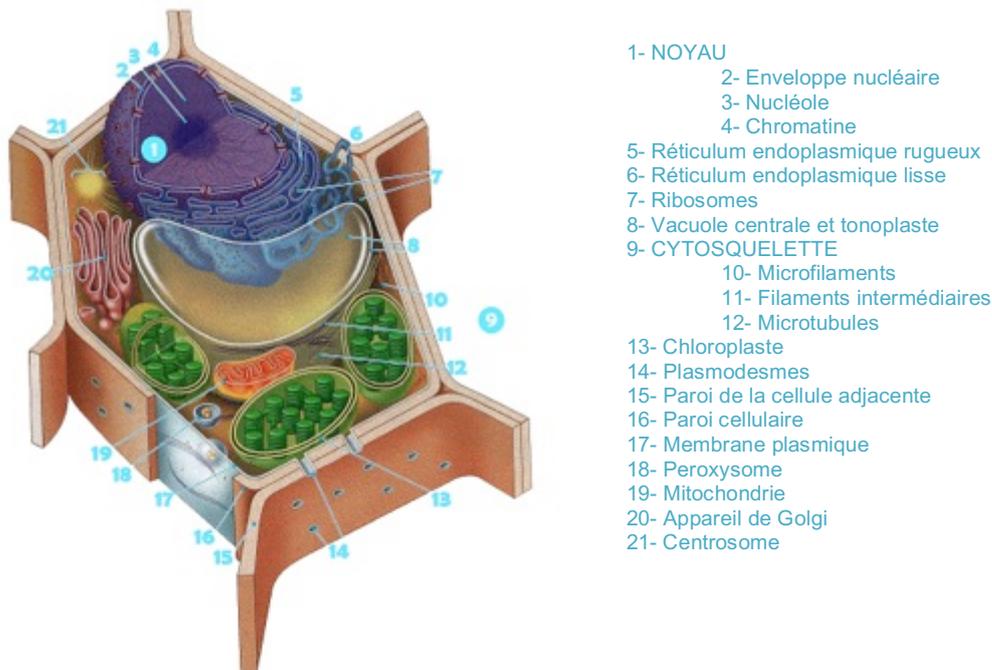


Figure I-7 : Schéma de la cellule végétale d'après Campbell et al. 2004 [20]

Elle est délimitée par une membrane plasmique (N°17), entourée d'une paroi cellulaire (N°15-16) épaisse et caractéristique dont la structure semi-rigide et complexe détermine la taille et la forme des cellules tout en assurant leur maintien (tenue face aux fortes pressions osmotiques intracellulaires) et leur cohésion. Elle est responsable de la rigidité des végétaux et participe à la croissance des tissus. Elle contribue à la régulation des échanges entre les cellules et avec l'extérieur : transport, absorption, sécrétion de multiples substances chimiques (ions, métabolites...). Enfin, elle joue un rôle de barrière contre la déshydratation, les changements de pression et les infections...

La paroi cellulaire présente 3 niveaux d'organisation (Figure I-8) (Colin-Henrion 2008 [18]) :

- La lamelle moyenne se situe dans la zone intercellulaire formée lors de la séparation des cellules. Elle se forme en premier, à la fin de la division cellulaire. Essentiellement constituée de substances pectiques, elle assure la cohésion entre cellules voisines.
- La paroi primaire est localisée entre la membrane plasmique et la lamelle moyenne. Les jeunes cellules immatures la synthétisent en second par dépôt de cellulose à partir de la lamelle moyenne. La structure est donc biphasique, composée d'un réseau lâche de microfibrilles cellulosiques enchâssé dans une matrice amorphe de substances pectiques, hémicelluloses et protéines. Elle est fine, souple et de faible résistance mécanique.
- La paroi secondaire se trouve entre la paroi primaire et la membrane plasmique. Elle est élaborée en dernier par les cellules en fin de croissance, au moment de leur différenciation. Il

s'agit d'une triple couche de cellulose. Sa composition est semblable à celle de la paroi primaire mais avec des proportions différentes. De plus, des lignines s'insèrent dans les espaces interfibrillaires et imperméabilisent les parois. C'est une matrice très résistante et durable.

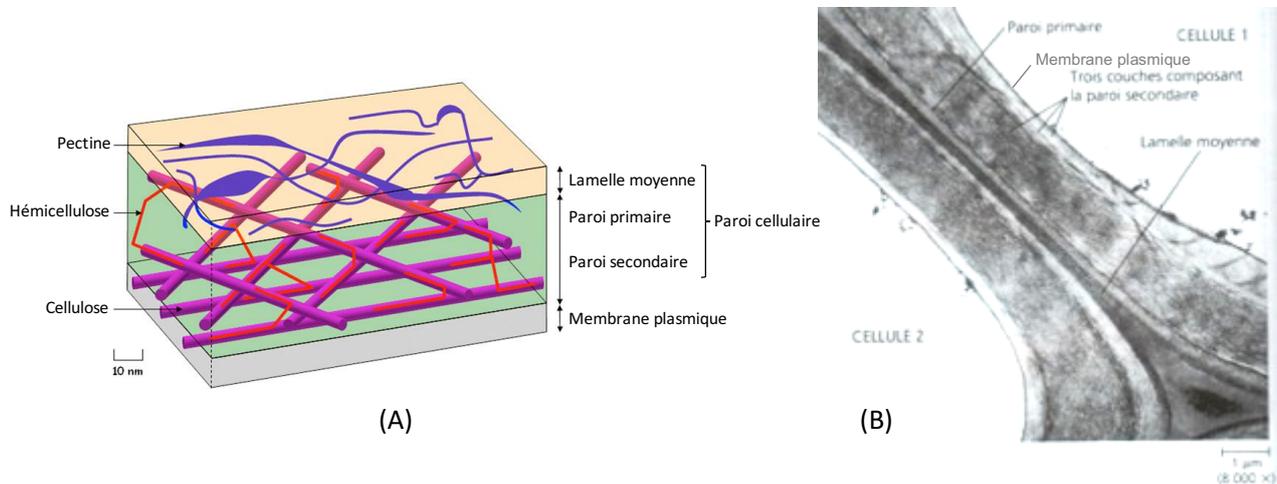


Figure I-8 : Paroi cellulaire végétale schématisée (A) d'après Colin-Henrion 2008 [18] et observée au MET (B) d'après Campbell et al. 2004 [20]

La paroi cellulaire est ponctuée de plasmodesmes (N°14), canaux reliant le cytoplasme d'une cellule à une autre et assurant les échanges chimiques intercellulaires en permanence. Ils se forment en même temps que la lamelle moyenne.

1. 4. 2. Biochimie structurale végétale

La paroi cellulaire est principalement composée de polysaccharides (cellulose, hémicelluloses et pectines) mais également de protéines structurales, d'enzymes et de polymères phénoliques (lignine et subérine), qui peuvent être classés de la façon suivante (Colin-Henrion 2008 [18], Simon 2009 [21]) :

- Les composés permanents sont métabolisés dans le cytoplasme de la cellule et excrétés à l'extérieur pour former la paroi cellulaire (cellulose, hémicelluloses, pectines),
- Les composés d'incrustation (lignines, minéraux, gommés et mucilages) se déposent entre les microfibrilles de cellulose des parois primaire et secondaire à la place des substances matricielles habituelles,
- Les composés d'adcrustation (cutine, cires et subérine) sont déposés à l'extérieur de la membrane et forment une couche externe qui peut disparaître. Cette couche est réputée imperméable, limitant les échanges d'eau et de gaz.



Figure I-9 : Les principaux constituants des fibres alimentaires d'après Colin-Henrion 2008 [18]

a- Les polysaccharides pariétaux

Ce sont essentiellement les composés permanents de l'exosquelette végétal, mais également les gommages et mucilages des composés d'incrustation ou d'imprégnation.

Les polysaccharides sont des homo ou hétéropolymères constitués d'un enchaînement linéaire ou ramifié de pentoses, d'hexoses, d'acides hexuroniques ou de désoxyhexoses.

Les polysaccharides permanents peuvent être classés par solubilité décroissante de la façon suivante :

- Les pectines (Figure I-3, A) hydrosolubles et solubles dans certaines solutions d'agents chélatants du calcium sont des colloïdes aux propriétés gélifiantes bien connues qui jouent le rôle de ciment intercellulaire, principalement localisées au niveau de la lamelle moyenne. Elles se composent d'hétéropolysaccharides acides de galacturonate dont les chaînes sont assemblées en angle droit par du rhamnose et reliées ensuite par des ions calcium et magnésium pour former des feuillettes. Les pectines des pommes sont composées majoritairement d'acide galacturonique (jusqu'à 80 % molaire) mais également de galactose, arabinose, rhamnose, xylose, glucose et mannose (Massiot *et al.* 1994 [22]).
- Les hémicelluloses (Figure I-8, A) solubles dans les bases diluées, à caractère polaire sont des polymères hétérogènes linéaires ramifiés. Elles jouent le rôle de liaison entre les microfibrilles de cellulose. Elles sont de natures différentes selon les végétaux et selon qu'elles rentrent dans la composition de la paroi primaire (xyloglucanes) ou de la paroi secondaire (xylanes et glucomannanes).
- La cellulose (Figure I-8, A) est une molécule hydrophile mais totalement insoluble dans la plupart des solvants et notamment dans l'eau dans laquelle elle gonfle, également résistante aux attaques chimiques et enzymatiques. Elle se dégrade par l'action biochimique de la cellulase. C'est un homopolymère en β 1-4 de cellobiose, diholoside formé par la condensation en β 1-4 de deux molécules de glucose. La conformation du polymère de cellulose solidifié par des liaisons hydrogène est linéaire. La cellulose s'organise en microfibrilles très résistantes mécaniquement tout en restant déformables pour conférer à la

paroi cellulaire souple et élasticité. La structure capillaire des microfibrilles rend la cellulose perméable aux gaz et à l'eau.

La composition moyenne des parois cellulaires des fruits en général est similaire à celle des parois primaires. Elles sont donc relativement pauvres en lignines et principalement constituées de polysaccharides (cellulose, hémicelluloses et pectines) (Colin-Henrion 2008 [18]).

Quant aux gommages et mucilages des composés d'imprégnation, ce sont des polysaccharides hétérogènes hydrophiles et aux propriétés colloïdales. Ils gonflent au contact de l'eau provoquant une hypertrophie de la lamelle moyenne de l'exosquelette, en formant une masse gélatineuse. C'est une source de glucides pour le végétal. Ils jouent également un rôle de ciment intercellulaire en contribuant à la liaison des microfibrilles de cellulose entre elles.

b- Les composés non polysaccharidiques

Ce sont les composés d'incrustation (sauf les gommages et les mucilages) et d'adcrustation.

Les composés d'incrustation ou d'imprégnation non polysaccharidiques sont de deux types :

- Les lignines sont des hétéropolymères d'alcools dérivant du phénylpropane liés par des liaisons éther, ester ou carbone-carbone : alcool coniférylique, alcool p-coumarique, alcool sinapylique. Ils sont insolubles, hydrophobes, imperméables à l'eau mais mouillables. Ils forment un dépôt (lignification) dans les espaces libres autour de la cellulose et des autres polymères des membranes de la lamelle moyenne et des parois primaire et secondaire de l'exosquelette du végétal. La lignification conduit à la formation de liaisons irréversibles, non hydrolysables par la plante elle-même.
- Les minéraux, silice SiO_2 (silification) ou carbonate de calcium CaCO_3 (calcification) se déposent sur certains tissus spécifiques de la plante comme les poils.

Quant aux composés d'adcrustation, il s'agit de lipides :

- La cutine est le composé principal de la cuticule, film protecteur le plus externe de l'épiderme d'un végétal. La cutine est une molécule tridimensionnelle, insoluble dans les solvants hydrophobes.
- Les cires sont de deux types : épicuticulaire (dépôt sur la cuticule) ou intracuticulaire (dépôt dans la cuticule). Leur présence dans les végétaux n'est pas systématique. Elles se présentent sous différentes formes : bâtonnets, granulation, pellicule, pruine... Les cires sont hydrophobes, particulièrement imperméables aux gaz et à l'eau. Elles contrôlent ainsi la transpiration des végétaux.
- La subérine imprègne la paroi des cellules. Elle rentre dans la composition du suber. Le suber est une structure lamellaire faite d'une succession de couches de triglycérides et de cutine et d'une couche monomoléculaire de cires. La subérine est un polymère hydrophobe, imperméable à l'eau et présentant des propriétés d'isolation thermique. Les cellules imprégnées de subérine sont des cellules mortes. C'est le constituant principal du liège mais on le trouve dans bon nombre de végétaux au niveau des racines et des tiges.
Dans les fruits, le liège peut être présent sur tout ou partie du fruit. Une carence en bore due à un sol défaillant ou une mauvaise absorption par le fruit entraîne la formation de liège sur la pomme (Figure I-10).



Figure I-10 : Formation de liège sur une pomme

La cutine et la subérine se dégradent en α et ω -diacides et en hydroxyacides (Kopogbemabou 2011 [23]).

1. 5. La composition chimique de *Malus domestica*

La pomme est composée de trois grands principaux organes (Figure I-4) :

- L'épiderme ou peau,
- Le réceptacle ou chair ou pulpe,
- L'endocarpe ou trognon.

Chacun de ces organes présente des caractéristiques propres : l'épiderme est riche en lipides (cutine et cires), le réceptacle est riche en glucides (fructose, glucose, saccharose) et l'endocarpe, qui est une partie plus dure contenant les pépins, sera plus riche en lignine. L'eau reste majoritaire dans l'ensemble de ces tissus, à plus de 70 %.

La plupart des travaux sur la composition chimique des pommes concernent le fruit entier avec ou sans l'épiderme. La caractérisation de l'épiderme va dépendre de la méthode de préparation de l'échantillon. En règle générale, le fruit est pelé et l'épiderme est traité enzymatiquement de façon à réduire au maximum les fibres et la pectine. L'épiderme est alors réduit au minimum et ce résidu porte le nom de cuticule. La cuticule est essentiellement constituée de cutine et de cires qui représentent la part de lipides dans le fruit. Sans traitement préalable, des fibres (cellulose et hémicelluloses) et des pectines peuvent être présents à des quantités qui vont dépendre de l'épaisseur des pelures (présence des cellules de l'épiderme et de l'hypoderme et de quantités variables de réceptacle).

1. 5. 1. Composition chimique du fruit

La composition chimique générale de la pomme est présentée dans le Tableau I-3 ci-après (Colin-Henrion 2008 [18], Campeanu *et al.* 2009 [24], Wu *et al.* 2007 [25]). C'est un fruit très riche en eau (> 70 %) et en glucides (10 %). La teneur en lipides est très faible (0,3 %) car ils sont exclusivement localisés dans la peau, qui représente environ 10 % massique du fruit. La teneur en fibres de la pomme est plus élevée lorsqu'elle est analysée avec la peau (environ 2 % du poids humide soit 14 % MS) que sans la peau (environ 1,5 % du poids humide soit 10 % MS).

Composition	Nature	% du poids humide
Glucides	Fructose 50 % Glucose 18 % Saccharose 22 % Sorbitol 4-5 % Pentosanes+hexosanes 5-6 %	8-12
Protéines	Parois cellulaires	3-5
Lipides	Epicarpe : - Cires cuticulaires - Cutine-Subérine	0,3
Acides organiques	Acide malique (majoritaire) Acide quinique Acide succinique Acide citrique 4-5 % Acide tartarique Acide shikimique	0,6
Fibres*	Polysaccharides pariétaux : - Cellulose 30 % MS - Hémicellulose 17 % MS - Pectines 35 % MS Lignines 0,2 %	2,1
Eau		75-88

Tableau I-3 : Composition chimique générale de la pomme d'après Colin-Henrion 2008 [18] et Wu et al. 2007 [25]

* La caractérisation des polysaccharides pariétaux présents dans les cellules du réceptacle (chair) de la pomme est représentée dans le Tableau I-4 (Massiot et al. 1997 [26]).

Extraction	Matériel insoluble à l'eau	Matériel insoluble à l'alcool
Caractérisation	Fibres	Précipitation des polysaccharides dont pectines et protéines
Rendement (% MS)	8,2	10,4
Polysaccharides totaux (%)	87,0	85,7
Composition (%) :		
Acide galacturonique	27,2	31,2
Glucose	41,8	39,0
Arabinose	8,4	8,6
Galactose	6,9	7,0
Xylose	9,9	8,6
Mannose	2,6	2,3
Rhamnose	2,0	1,9
Fucose	1,1	1,3

Tableau I-4 : Caractérisation chimique des fibres pariétales du réceptacle charnu de pomme d'après Massiot et al. 1997 [26]

La paroi cellulaire des pommes est donc constituée majoritairement de polysaccharides (entre 70 et 80 %), essentiellement des pectines (environ 30% d'acide galacturonique) et de la cellulose (> 30 %). La pomme est pauvre en lignines : 200 mg pour 100 g de fruits non épluchés (Colin-Henrion 2008 [18], Marlett et al. 1994 [27]).

La pomme renferme également 320 mg / 100 g de minéraux et oligo-éléments. Elle est très riche en vitamines B, E, pro-vitamine A et C. Le contenu en vitamine C varie de 2 à 25 mg / 100 g selon les variétés et se concentre dans la peau (4 à 6 fois plus que dans la chair).

Le Tableau I-5 compare les compositions moyennes en sucres simples, acides organiques et polyphénols des pommes Gala, Fuji et Pink Lady (Bureau *et al.* 2012 [28]).

Composition (g/kg de poids frais)	GALA	FUJI	PINK LADY
Taux de Brix (°Brix)	42	32	13
Sucres simples totaux :			
Fructose	57	62	45
Glucose	16	22	8
Saccharose	27	22	54
Acides organiques :			
Malique	3,5	2,8	6,0
Citrique	0,12	0,01	0,01
Polyphénols totaux	0,67	0,44	0,41
Acides phénoliques :			
Acide chlorogénique	0,13	0,10	0,095
Acide p-coumaroylquinique	0,009	0,003	0,003
Flavanols :			
Catéchines	0,007	0,007	0,000
Epicatéchines	0,032	0,056	0,053
Procyanidines	0,49	0,26	0,25
Dihydrochalcones :			
Phlorétine	0,005	0,003	0,003
Phloridzine	0,006	0,008	0,003

Tableau I-5 : Teneurs en glucides, acides organiques et polyphénols des réceptacles charnus de pommes Gala, Fuji et Pink Lady à maturité d'après Bureau *et al.* 2012 [28]

Les compositions de la Gala et de la Fuji sont assez similaires. La Gala contient néanmoins deux fois plus de procyanidines que les deux autres variétés. En revanche, la composition en sucres de la Pink Lady est différente de celle des deux autres variétés : le saccharose devient le sucre majoritaire et le taux de glucose est deux à trois fois plus faible.

1. 5. 2. Composition chimique de l'épiderme des pommes

La composition chimique générale de l'épiderme des pommes diffère de celle des fruits. En effet, elle concentre les lipides cuticulaires et les composés phénoliques (Tableau I-6) (Massiot *et al.* 1994 [22]). La plupart de ces composés, notamment les lipides et les polyphénols, sont issus de la biosynthèse du végétal et sont soumis à des variabilités d'un individu à l'autre liées à de nombreux paramètres, biotiques (espèce...) et abiotiques (stress hydrique, UV, attaques fongiques (production de flavanols pour lutter contre la tavelure), insectes...).

Composition	% massique épiderme
Oses pariétaux totaux	59
Lipides (cires, cutine-subérine)	30
Protéines pariétales	3-6
Polyphénols	% massique polyphénols dans la pomme
- Acides phénoliques :	9-39
- Acide chlorogénique majoritaire	
- Acide 4'-p-coumaroylquinique	
- Acide 5'-p-coumaroylquinique	
- Acide 5'-p-caféoylquinique	
- Flavanols :	44-88
- Catéchines	
- Epicatéchines	
- Tanins condensés 0,1 % (procyanidines B1, B2, B3, B5 et C1)	
- Flavonols :	< 0,5
- Quercétine	
- Quercétine-3-rhamnoside	
- Quercitrine	
- Hypérine	
- Isoquercitrine	
- Reynoutrine	
- Avicularine	
- Rutine	
- Dihydrochalcones :	1-5
- Phlorétine	
- Phloridzine	
- 2'-O-xyloglucoside de phlorétine	
- Anthocyanes :	0,4-0,26 mg/g masse sèche d'épiderme
- Cyanidine	
- Idéaïne	
- Coumarines	3-15

Tableau I-6 : Composition chimique générale de l'épiderme des pommes d'après Colin-Henrion 2008 [18], Massiot et al. 1994 [22], Wu et al. 2007 [25], Verdu 2013 [29], Travers 2002 [30], Veberic et al. 2005 [31] et Awad et al. 2000 [32]

La pomme est un fruit riche en polyphénols et minéraux. Les polyphénols, concentrés dans les parties les plus externes des végétaux (épiderme des feuilles et des fruits), en absorbant les UV, protègeraient l'ADN, les pigments photosynthétiques et les lipides membranaires (Verdu 2013 [29]). Ils se répartissent dans la pomme comme suit (Guyot et al. 2000 [33]) :

- 65 % dans le réceptacle charnu,
- 24 % dans l'épiderme,
- 10 % dans l'endocarpe lignifié (trognon),
- 1 % dans les graines (pépins).

Cependant, les valeurs rapportées en mg/g de matière sèche montrent que l'épiderme localise la majorité des polyphénols (Figure I-11), suivie par les graines, l'endocarpe et le réceptacle (Awad et al. 1998 [32]). En particulier, les flavonols et les flavanols se concentrent dans l'épiderme mais les acides phénoliques sont majoritairement localisés dans le réceptacle. Le mésocarpe et les graines sont également plus riches en dihydrochalcones que l'épiderme.

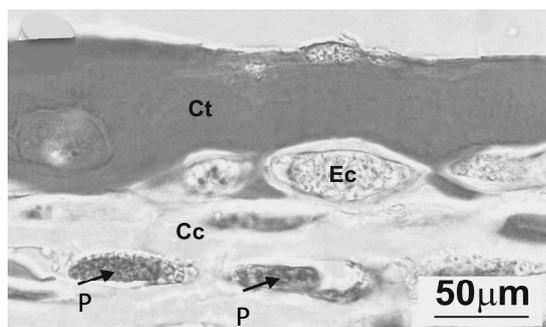


Figure I-11 : Coupe transversale d'un épiderme de pomme Gala observée sur microscope Leica DM LB après coloration des substances lipidiques au Soudan IV d'après Tessmer et al. 2012 [34]

Légende : Ct = cuticule

Cc = cellule du collenchyme

Ec = cellule de l'épiderme

P = polyphénols

L'étude de Henriquez *et al.* de 2012 montre qu'il y a environ deux fois plus de polyphénols totaux et de minéraux et de trois à quatre fois plus d'oligoéléments dans les épidermes des pommes Gala, Fuji et Pink Lady que dans les fruits (Tableau I-7) (Henriquez *et al.* 2012 [35]). Il n'apparaît pas d'effet variété significatif : toutes les teneurs sont similaires.

	GALA	FUJI	PINK LADY
% massique peau	6,6 ± 0,5	6,5 ± 0,3	5,1 ± 0,3
% massique chair	66,5 ± 1,3	63,9 ± 0,8	69,4 ± 1,2
% massique cœur	17,1 ± 1,2	20,8 ± 1,0	18,6 ± 1,5
Taux de Brix (°Brix)			
Epiderme	13,8 ± 0,2	12,8 ± 0,7	14,0 ± 0,3
Fruit entier	14,0 ± 0,2	12,7 ± 0,8	15,5 ± 0,1
Polyphénols totaux (éq. mg AG/ g humide)			
Epiderme	6	6,1	5,8
Fruit entier	2,9	2,8	2,7
Minéraux = N+P+K+Ca+Mg+Na (mg/100 g humide)			
Epiderme	267,5 ± 7,9	300,4 ± 12,9	286,5 ± 15,8
Fruit entier	159,8 ± 5,7	169,9 ± 5,2	199,5 ± 4,8
Eléments traces = Fe+Mn+Cu+Zn (mg/100 g humide)			
Epiderme	1,22 ± 0,00	1,49 ± 0,40	1,31 ± 0,07
Fruit entier	0,29 ± 0,00	0,41 ± 0,04	0,44 ± 0,04

Tableau I-7 : Répartition des teneurs en sucre, polyphénols, minéraux et oligo-éléments entre l'épiderme et le fruit des variétés Gala, Fuji et Pink Lady d'après Henriquez *et al.* 2012 [35]

De façon plus détaillée, la teneur relative en polyphénols totaux se répartit par moitié entre l'épiderme et le réceptacle, à l'instar en particulier des procyanidines et de la phloridzine (Tableau I-8). L'acide chlorogénique se trouve majoritairement dans le réceptacle des fruits tandis que les flavonols se concentrent dans l'épiderme. Les pommes Gala et Pink Lady étant de couleur rouge dominante, elles contiennent des anthocyanes exclusivement localisés dans leur peau.

Polyphénols	GALA		PINK LADY	
	Epiderme	Réceptacle	Epiderme	Réceptacle
Totaux	50	50	43	57
Acide chlorogénique	10	90	12	88
Flavanols dont procyanidine	32 53	68 47	29 49	71 51
Flavonols	96	4	93	7
Phloridzine	43	57	51	49
Anthocyanes	100	0	100	0

Tableau I-8 : Composition relative en polyphénols entre l'épiderme et le réceptacle charnu des pommes Gala et Pink Lady d'après McGhie et al. 2012 [36]

L'épiderme est également plus riche en fibres que le fruit : 2,0-2,7 g de fibres pour 100 g de fruit avec épiderme contre 1,5-1,8 g / 100 g de fruit sans épiderme (Colin-Henrion 2008 [18]). Par rapport au réceptacle (Tableau I-4), l'épiderme contient 2,5 fois plus de fibres (Tableau I-9) (Massiot *et al.* 1997 [26]). Les parois cellulaires de l'épiderme de la pomme contiennent moins de polysaccharides : 50 % en moyenne contre plus de 85 % pour le fruit. Cette différence est relative à la présence exclusive dans la peau des lipides cuticulaires qui représentent environ 30% (Tableau I-6).

Extraction	Matériel insoluble à l'eau	Matériel insoluble à l'alcool
Caractérisation	Fibres	Précipitation des polysaccharides dont pectines et protéines
Rendement (% MS)	22,9	26,5
Polysaccharides totaux (%)	46,8	57,7
Composition (%) :		
Acide galacturonique	36,5	36,6
Glucose	32,3	32,0
Arabinose	12,6	12,8
Galactose	6,6	7,1
Xylose	6,0	6,1
Mannose	3,0	2,9
Rhamnose	1,9	1,6
Fucose	1,1	0,9

Tableau I-9 : Caractérisation chimique des fibres pariétales de l'épiderme des pommes d'après Massiot *et al.* 1997 [26]

1. 6. Les intrants phytosanitaires

La production maraîchère est indissociable des traitements phytosanitaires. Les enjeux économiques, la productivité et l'accroissement constant de la population mondiale ont suscité un développement hors norme de la chimie des phytosanitaires.

D'une manière générale, en France, la cadence, les cultures et la fréquence de traitement sont des critères plus importants que la nature même des produits phytosanitaires. Tous les producteurs utilisent plus ou moins les mêmes produits. Dans le Sud-Ouest, ils suivent les préconisations Sud-Ouest qui sont établies à partir des groupes de réflexion mixtes (Chambre Régionale d'Agriculture, DGAL, Organisation des Producteurs, CEFEL, FREDON/FREDEC – analyse des risques ravageurs/maladies...) :

- tous les lundis, la Chambre Départementale d'Agriculture coordonne un comité de rédaction qui rédige le Bulletin de Santé des Végétaux (BSV). C'est un document officiel édité tous les mardis par la Chambre régionale d'Agriculture et qui fait état des risques effectifs liés aux différents bio-agresseurs.
- Le mardi, les techniciens de l'Organisation des Producteurs se réunissent avec la Chambre d'Agriculture et le CEFEL afin de faire un état des lieux de la situation sanitaire (éventuellement complément apporté au BSV avant édition) et d'échanger des informations qui seront la base des bulletins techniques.

Le BSV renvoie uniquement sur un risque effectif tandis que le bulletin technique renvoie à un choix de produits commerciaux pour traiter le risque.

Le Guide Arbo du Sud-Ouest constitue un document de référence en matière de protection des cultures pour la région. Il est rédigé pour l'année par le groupe mixte (DGAL, OP, FREDON/FREDEC, Chambre d'Agriculture, CEFEL...) qui se réunit une fois par an pour définir les préconisations phytosanitaires par culture.

Le choix et le positionnement des traitements dépendent de nombreux facteurs. Parmi les plus sensibles, il faut noter :

- la pression des bio-agresseurs,
- le niveau d'efficacité des produits,
- la variété, plus ou moins résistante,
- la période de récolte, plus ou moins tardive (donc pluvieuse),
- les délais à respecter entre le traitement et la récolte,
- le nombre maximum d'applications par molécule phytosanitaire,
- les critères clients,
- la rémanence des molécules phytosanitaires.

La production intensive de pommes et la multiplicité des variétés (Figure I-12) sont à l'origine d'un usage important de produits phytosanitaires. Le niveau de pression parasitaire varie selon les saisons mais également d'un département à l'autre.

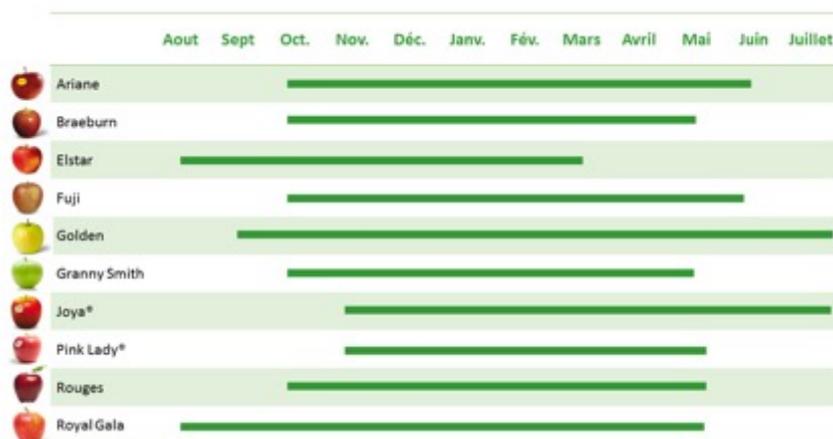


Figure I-12 : Production des Vergers du Sud : disponibilité saisonnière des différentes variétés de pommes (Données Blue Whale)

En matière de résistance intrinsèque de la variété et période de récolte, les pommes Gala sont une variété récoltée tôt dans la saison (Août, période plutôt sèche). Elles sont très sensibles à la tavelure et au chancre, un peu moins au mildiou et au feu bactérien. Le captane et le dithianon qui traitent deux sortes de tavelures, au verger et en conservation, peuvent être utilisés, mais pas de façon systématique, surtout si le verger est indemne de tavelure en fin des contaminations primaires. Le programme de traitement de conservation des pommes Gala est souvent très léger.

Les pommes Fuji sont récoltées plus tard, vers Octobre, période déjà pluvieuse. Le risque de tavelure est plus important. Ces pommes sont très sensibles à la tavelure, à la rouille et au feu bactérien. Elles reçoivent alors plus de phytosanitaires de conservation (fludioxonil).

Les pommes Pink Lady sont généralement récoltées fin Novembre. Elles sont très sensibles à la tavelure et au puceron cendré. Elles constituent une référence pour le CEFEL en matière de sensibilité vis-à-vis du *Gloeosporium* (infection aux champs en conditions humides et développement en aval dans les chambres de conservation). C'est une pomme à la marque déposée, très médiatisée (site internet et réseaux sociaux) et qui doit répondre à des critères bien précis de couleur rose, taux de sucre... pour pouvoir arborer le logo rose en forme de cœur qui la distingue de toutes les autres variétés. Les enjeux économiques et sa grande fragilité contribuent à faire d'elle l'une des pommes les plus traitées. Elle est traitée systématiquement (2 à 3 traitements de conservation / fludioxonil, pyraclostrobine et boscalid).

1. 6. 1. Historique

Aux origines, l'homme préhistorique n'est que très peu concerné par les parasites en raison de sa vie nomade, de l'absence de cultures et de stockage des aliments. Son mode de vie rustique consiste à se gratter et s'épouiller. Dix mille ans plus tard, la vie se sédentarise entre temps, l'agriculture se développera et les animaux seront domestiqués. La croissance de la population mondiale aura pour conséquence la production et le stockage de grandes quantités de nourriture (céréales, fruits et légumes, animaux) et de textile. Ces changements fondamentaux du mode de vie entraîneront la survenue de nombreux parasites, qui ponctuera la vie des hommes (invasions d'insectes rapportées par la Bible ou représentées sur des peintures rupestres en Algérie...) (Figure I-13).

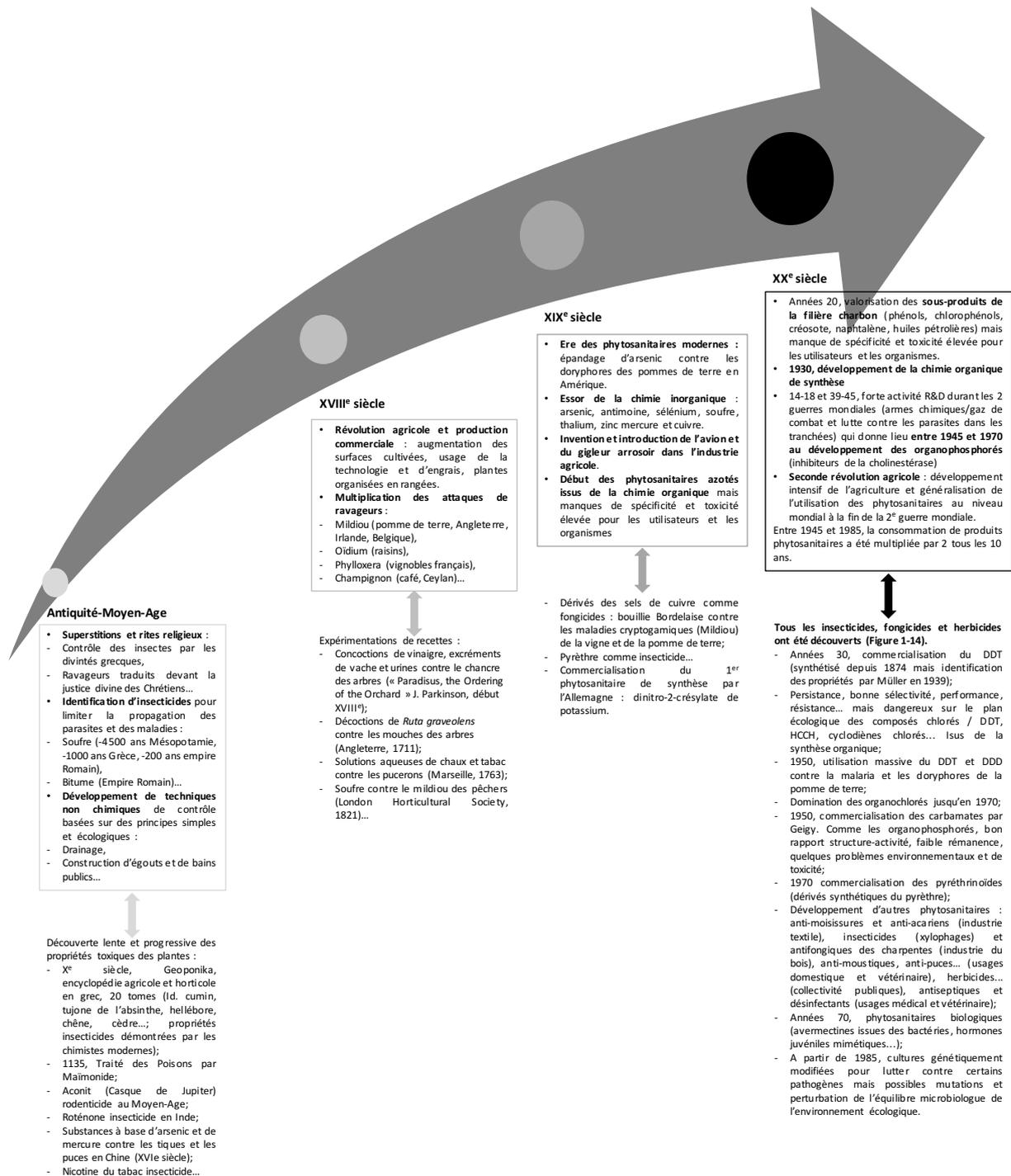


Figure I-13 : Les points essentiels du développement des produits phytosanitaires d'après Bonnefoy 2012[37], ORP [38] et LNE 2008 [39]

Au XX^e siècle, toutes les familles chimiques constituant les insecticides, fongicides et herbicides ont été découvertes (Figure I-14). La Recherche et le Développement inhérents aux deux guerres mondiales et le développement de la chimie de synthèse ont provoqué une explosion des produits phytosanitaires.

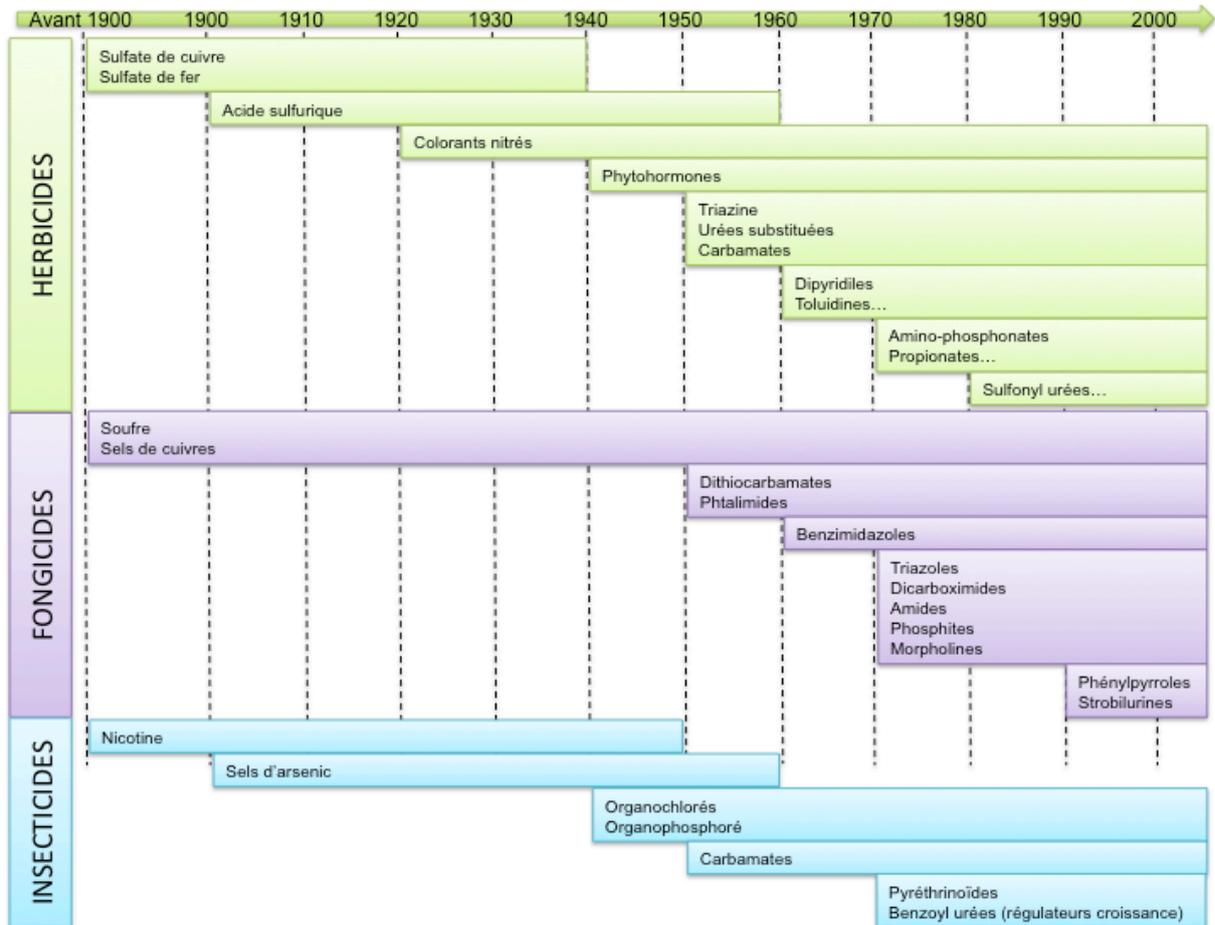


Figure I-14 : Historique de l'évolution des trois grandes familles des produits phytosanitaires au XX^e siècle d'après Bonnefoy 2012 [37]

Le développement des produits phytosanitaires est indissociable du développement agricole des 50 dernières années. L'accroissement de la population et la mondialisation ont été à la base de la mise en place de systèmes de production intensifs. Meilleurs rendements, maîtrise du risque sanitaire pour répondre aux besoins toujours croissants de la population. Les quantités et la nature des phytosanitaires sont des données variables localement : certains pays comme la France utilisent plus de fongicides alors que les insecticides sont plus présents dans les régions tropicales du Globe.

Le recours aux phytosanitaires par le monde agricole a permis de réduire de 50 % le niveau de déforestation en augmentant les rendements des terres cultivables (*International Workshop on Crop Protection Chemistry*, 14-17/02/2005, San Jose, Costa Rica). Toutefois, leur utilisation excessive a révélé récemment de nombreux impacts négatifs :

- environnementaux liés au caractère lipophile des molécules :
 - rémanence dans les sols et les eaux,
 - pollution de l'air,
 - bioaccumulation...
- sanitaires :
 - résistances chez certains organismes comme les insectes (14 résistances en 1948, 224 en 1969 et plus de 500 en 1990),
 - troubles de la reproduction chez certaines espèces,
 - mortalité des abeilles,

- déclin de prédateurs (aigles à tête blanche, faucons pèlerins...),
- risques des professions agricoles,
- exposition des riverains,
- résidus dans les denrées alimentaires...

Mais aujourd'hui, en Europe et en France, la quantité de phytosanitaires utilisés tend à diminuer : interdictions régulières de molécules, meilleure efficacité des nouveaux produits, prise de conscience des impacts. Pour faire suite au Grenelle de l'Environnement, le plan Ecophyto 2018 est lancé en 2008 (Ministère de l'Agriculture et de la Pêche 2008 [40]). La France souhaite diviser par deux les traitements phytosanitaires dans l'industrie agricole en dix ans (Plan Ecophyto I). En 2015, une nouvelle version du plan (Plan Ecophyto II) prévoit toujours une diminution de 50 % entre 2018 et 2025, en deux temps : 25 % d'ici à 2020 et 25 % de plus jusqu'à 2025 (Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt 2015 [41]). Il s'organise selon 8 axes dont les objectifs principaux sont concentrés sur la réduction des utilisations de produits phytosanitaires de traitement (PPT) par le recensement des systèmes agricoles et des moyens (contrôle de tous les pulvérisateurs), l'innovation en matière de systèmes économes en PPT, la formation à la réduction et à la sécurisation de l'utilisation des PPT (Certiphyto, mutualisation des bonnes pratiques dans des fermes pilotes...), la surveillance des bio-agresseurs (mise en ligne des BSV par région) et des conséquences de l'utilisation des PPT, la réduction et la surveillance de l'utilisation de produits phytopharmaceutiques en zone non agricole. L'Etat français organise le suivi du plan sur le territoire national et les DOM ainsi que la communication sur l'avancement de la réduction. Tous les utilisateurs sont impliqués au sens professionnel (monde agricole), au sens collectivités (services municipaux et départementaux) et au sens privé (jardiniers amateurs) (Ministère de l'Agriculture et de la Pêche 2008 [40]).

1. 6. 2. Composition d'un produit phytosanitaire

Un produit phytosanitaire est formulé à partir d'un ou de plusieurs ingrédients actifs et d'adjuvants dont le but est d'optimiser la pénétration et l'action des matières actives à la surface des végétaux (Herzfeld et Sargent 2011 [42]) :

- un support liquide tel qu'un solvant (huiles végétales) pour des liquides ou une charge solide (argile, talc) pour des solides pour diluer l'ingrédient actif,
- des tensio-actifs pour optimiser le contact entre la formulation et la surface à traiter,
- des adjuvants tels que des stabilisants, des adhésifs, des émulsionnants, des antitranspirants, des colorants, des matières répulsives, des émétiques et parfois des antidotes et des substances sans activité biologique mais pouvant améliorer l'activité phytosanitaire et faciliter son utilisation.

a- Les ingrédients actifs

Un actif phytosanitaire présente dans sa structure une ou plusieurs fonction(s) chimique(s) qui assure(nt) le pouvoir « pesticide » et des fonctions chimiques qui lui confèrent une plus ou moins grande solubilité dans l'eau ou dans l'huile (coefficients de partage octanol-eau). L'affinité d'un phytosanitaire pour l'eau ou les corps gras va conditionner sa pénétration dans l'organisme cible.

La classification des actifs phytosanitaires est rendue complexe par le nombre et la variété de structures chimiques, groupes fonctionnels et activités couvertes (LNE 2008 [39]). Globalement, deux

modes de classification sont utilisés pour répertorier les phytosanitaires : selon leur activité biologique ciblée ou selon leur nature chimique.

- Classification selon l'activité biologique ciblée. La base de données SIRIS Pesticides 2012 (Système d'Intégration des Risques par Intégration des Scores) de l'INERIS répertorie 26 activités biologiques distinctes dont les trois principales sont surlignées en gras :
 - Acaricides
 - Algicides,
 - Antimousses,
 - Antioxydants,
 - Antirugogènes,
 - Avicides
 - Bactéricides
 - Contre les maladies à virus et mycoplasmes,
 - Contre les maladies physiologiques
 - **Fongicides**,
 - Fumigènes,
 - Graminicides,
 - **Herbicides**,
 - **Insecticides**,
 - Ixodocides,
 - Médiateurs chimiques,
 - Molluscicides,
 - Nématocides,
 - Phytoprotecteurs,
 - Régulateurs de croissance,
 - Répulsifs (insectes, oiseaux-corvidés, mammifères...),
 - Rodenticides,
 - Stimulateurs des défenses naturelles des végétaux,
 - Synergisants,
 - Taupicides.

Les herbicides sont de loin les plus courants de par le monde. Ils détruisent ou inhibent la croissance des herbes indésirables en agissant comme :

- perturbateurs de la régulation de l'auxine (hormone agissant sur la taille des cellules) et de la photosynthèse,
- inhibiteurs de la division cellulaire, de la synthèse des lipides, de la cellulose et des acides aminés.

Les fongicides détruisent ou inhibent le développement des champignons et des bactéries pathogènes tels que la tavelure, en agissant comme :

- inhibiteurs respiratoires et de la division cellulaire,
- perturbateurs de la biosynthèse des acides aminés et des protéines et du métabolisme des glucides.

Les insecticides détruisent les arthropodes tels que les insectes et les mites ou inhibent leur reproduction :

- neurotoxiques,
- régulateurs de croissance,
- inhibiteurs de la respiration cellulaire.

- Classification selon la nature chimique de la substance active majoritaire :
 - les organochlorés,
 - les organophosphorés,
 - les carbamates,

- les pyréthriinoïdes,
- les triazines,
- les urées substituées...

Les carbamates présentent autant de propriétés fongicides, herbicides et insecticides. Les organophosphorés sont surtout insecticides. Les propriétés des dérivés de l'urée sont plutôt de nature herbicide. Les organochlorés, les nicotinoïdes et les pyréthriinoïdes ont des propriétés insecticides. Les triazoles sont essentiellement fongicides (IRAC 2016 [43], Office des publications officielles des Communautés Européennes 2003 [44], McBean 2012 [45]).

Les phytosanitaires les plus utilisés en 2011 (Données Blue Whale) dans les vergers de pommiers du Midi-Pyrénées ont été répertoriés dans le Tableau I-10. Les classements chimique et biologique et les paramètres physico-chimiques (logKow, hydrosolubilité, pKa) y figurent ainsi que quelques données essentielles de stabilité (eau, UV et air, biodégradation) (Ministère de l'Agriculture [46], ANSES [47], Ineris [48], Mackay *et al.* 2006 [49]). La stabilité dans les sols n'est pas évoquée car elle dépend de nombreux paramètres telles que la nature des sols, le pH, la teneur en CO... Plusieurs valeurs sont disponibles dans les banques de données tenues par la Commission Européenne (Commission Européenne [50]). Les limites maximales de résidus autorisées par l'Union Européenne dans la pomme ont été actualisées en 2016 (Commission Européenne [50]).

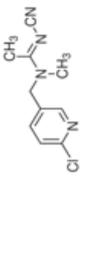
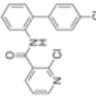
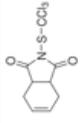
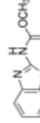
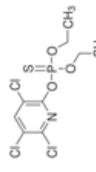
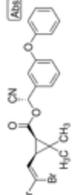
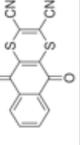
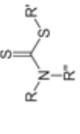
Molécule active	Formule	N°CAS	MM (g/mol)	Classement chimique	Classement biologique	LogKow (20-25°C pH7)	Hydrosolubilité (20-25°C pH7) (mg/L)	Dissociation dans l'eau : pKa (25°C)	Vitesse d'hydrolyse (DT50)	Vitesse de photolyse dans l'eau pH7 (DT50 en jours)	Biodegradation	Vitesse de dégradation dans l'air (DT50)	LMR UE 2016 (mg/kg)
Acétamipride		135410-20-7	222,67	nicotinoïde	insecticide	0,8	2950	0,7	Stable (22 et 45°C pH4-7)	34	non facilement biodégradable	0,14 jours	0,8
Boscalid		188425-85-6	343,21	carboxine	fongicide	2,96	4,64	aucune	> 60 jours (pH5-9)	> 30	Facile	-	2
Captaone		133-06-2	300,59	dicarboximide	fongicide	2,57	5,1	aucune	11-18,8h (25°C pH5), 2,6-4,9h (25°C pH7), 3,6-8,3h (25°C pH9)	-	non facilement biodégradable	< 1,5h	3
Carbendazime		10605-21-7	191,19	benzimidazole	fongicide				Interdite en France depuis 2007. Utilisation de son précurseur le thiophanate méthyle				0,2
chlorpyrifos-Ét		220-864-4	350,59	Organophosphoré	acaricide	4,7	1,05	aucune	-	-	non facilement biodégradable	1,4h	0,5
cis-deltaméthrine		52918-63-5	505,2	pyréthrinolide	insecticide	4,6	0,0002	aucune	Stable (25°C pH5-7)	48	non facilement biodégradable	16h	0,2
diphénylamine		122-39-4	169,22	pyridine	fongicide				Retirée par l'Europe en 2010				0,1
dithianon		3347-22-6	296,32	-	fongicide	3,2	0,38	aucune	12,2 jours (pH5), 0,594 jours (pH7), <1h (pH9)	<1 (pH4)	non facilement biodégradable	6,3h	3
Dithiocarbamates (CS2)		-	-	carbarnates	fongicides				Incluent le manébe, mancozébe, metram, propinèbe (non autorisé en France), thirame et ziramé				5

Tableau I-10 : Phytosanitaires utilisés en 2011 dans les vergers de pommiers de Midi-Pyrénées (1/3)

Molécule active	Formule	N°CAS	MW (g/mol)	Classement chimique	Classement biologique	LogKow (20-25°C pH7)	Hydrosolubilité (20-25°C pH7) (mg/L)	Disociation dans l'eau : pKa (25°C)	Vitesse d'hydrolyse (DT50)	Vitesse de photolyse dans l'eau pH7 (DT50 en jours)	Biodegradation	Vitesse de dégradation dans l'air (DT50)	LMR UE 2016 (mg/kg)
dodine		03/10/2439	287,44	guanidine	fongicide	0,76	1040	totalemment dissocié		Non renseignés			0,9
esfenvalérate		66230-04-4	419,9	pyréthrinolide	insecticide	6,5	<0,020	aucune		Non renseignés			0,1
fénazaquin		120928-09-8	306,4	quinazoline	acaricide	5,51	0,102	non applicable	9,6 jours (25°C pH5), 130 jours (25°C pH7), 219 jours (25°C pH9)	15	non facilement biodégradable	3321h	0,1
flonicamid		158062-67-0	229,16	nicotinoïde	insecticide	0,3 à 30°C	5200	-	204 jours (25°C pH9), 17,1 jours (40°C pH9), 9 jours (50°C pH9)	267	non facilement biodégradable	13,7 jours	0,2
fludioxonil		131341-86-1	248,19	phenylpyrrole	fongicide	4,12	1,8	14,1		10	non facilement biodégradable	3,6h	5
Flufenoxuron		101463-69-8	488,77	Acylurée	insecticide				Interdite en France (décision du 9 février 2012)				0,5
Hexythiazox		78587-05-0	352,88	thiazolidinone	acaricide	2,67	0,1	aucune	>2700 jours (22°C pH5-7), 504 jours (22°C pH9)	168	non facilement biodégradable	3,62h	1
Propargite		2312-35-8	350,47	ester de sulfite	acaricide				Interdite en France depuis 2011				0,01
Pyraclostrobrine		175013-18-0	387,82	stroblurine	fongicide	3,99	1,9 (pH5)	aucune	stable (25°C pH5-9)	1,7	non facilement biodégradable	<2h	0,5

Tableau I-10 : Phytosanitaires utilisés en 2011 dans les vergers de pommiers de Midi-Pyrénées (2/3)

Molécule active	Formule	N°CAS	MW (g/mol)	Classement chimique	Classement biologique	LogKow (20-25°C pH7)	Hydrosolubilité (20-25°C pH7) (mg/L)	Dissociation dans l'eau : pKa (25°C)	Vitesse d'hydrolyse (DT50)	Vitesse de photolyse dans l'eau pH7 (DT50 en jours)	Biodegradation	Vitesse de dégradation dans l'air (DT50)	LMR UE 2016 (mg/kg)
Pyrimicarbe		23103-98-2	238,29	carbamate	insecticide	1,7	3100	4,44	stable (25°C pH5-9)	0,095 (lumière estivale), 1,9 (lumière éq. 30°N)	non facilement biodégradable	<1h	2
Soufre		7704-34-9	32,07	minéral	acaricide-fongicide	non pertinent	0,063	aucune	non pertinent	-	non facilement biodégradable	-	aucune LMR préconisée
Spinosad		731,98 (A) 168316-95-8 et 746 (D)	731,98 (A) et 746 (D)	macrolides	insecticides	4 (A) et 4,5 (D)	235 (A) et 0,332 (D)	8,1 (A) et 7,9 (D)	très stable pH5-9	0,96 (A) et 0,84 (D)	facile	-	0,3
Spirodifène		148477-71-8	411,32	acide tétronique	acaricide	5,1	0,19	aucune	119,6 jours (20°C pH4), 52,1 jours (20°C pH7), 2,5 jours (20°C, pH9)	28,8 (pH4)	facile	2,67h	0,8
Tebuconazole		107534-96-3	307,82	triazole	fongicide	3,7	36	aucune	-	-	non facilement biodégradable	2,6 jours	0,3
Thiabendazole		148-79-8	201,25	carbamate-benzimidazole	fongicide	2,39	30	4,7 et 12	357 jours (25°C pH5), 203 jours (25°C pH7), 271 jours (25°C pH8)	1,2 (pH5)	facile	-	5
Thiactopride		111988-49-9	252,72	nicotinoïde	insecticide	1,26	184	aucune	stable (25°C pH5-9)	80	non facilement biodégradable	1,5h	0,3
Thiaméthoxam		153719-23-4	291,71	nicotinoïde	insecticide	-0,13	4100	aucune	640 jours (pH7), 8,4 jours (pH8)	3,1 (pH5)	non facilement biodégradable	0,5 à 2,5h	0,5
Thiophanate-méthyl		23564-05-8	342,39	carbamate benzimidazole	fongicide	1,45	20	7,3	>365 jours (25°C pH5), 36 jours (25°C pH7), 0,7 jour (25°C pH9)	2,2 jours (pH5)	facile	1,6 à 4,7 jours	0,5

Tableau I-10 : Phytosanitaires utilisés en 2011 dans les vergers de pommiers de Midi-Pyrénées (3/3)

b- Les tensio-actifs

Les phytosanitaires sont formulés pour être dispersibles en milieu aqueux et faciliter ainsi la manipulation et l'épandage. Cependant, la surface des végétaux est protégée par la cuticule fortement hydrophobe. Les gouttelettes, repoussées par l'hydrophobicité des cires et des cils cuticulaires, vont glisser sans adhérer à la surface des feuilles et des fruits. Les tensio-actifs

permettent aux gouttelettes d'adhérer et de s'étaler sur la surface à traiter. En modifiant la tension de surface des gouttelettes, l'angle de contact avec la surface à traiter va diminuer jusqu'à un étalement optimal. Un excès de tensio-actif entraîne un ruissellement excessif et donc une perte d'efficacité.

Le choix d'un tensio-actif est primordial car il peut aussi inhiber l'action du phytosanitaire et abîmer le végétal. Les tensio-actifs anioniques sont plus efficaces lorsqu'ils sont formulés avec des phytosanitaires de contact direct. Les tensio-actifs cationiques ne doivent pas être utilisés seuls car ils sont phytotoxiques. Enfin, les tensio-actifs non ioniques sont souvent utilisés avec des phytosanitaires systémiques car ils favorisent la pénétration des produits pulvérisés à travers la cuticule végétale.

c- Les additifs

- Les adhésifs augmentent l'adhésion des particules solides à la surface des végétaux, i.e. réduire le lessivage des matières actives au cas de pluie ou d'irrigation et retarder l'évaporation des gouttelettes,
- Les stabilisants ralentissent la photodégradation des matières actives,
- Les prolongateurs agissent comme les adhésifs, en maintenant le phytosanitaire en place sur son lieu d'action, en ralentissant l'évaporation et en inhibant la photodégradation,
- Les plastifiants améliorent la pénétration des matières actives ; leur efficacité dépend aussi de la nature du végétal,
- Les tampons ou modificateurs de pH maintiennent le pH des solutions entre 5,5 et 7,0 ; un pH basique entraîne la dégradation chimique du phytosanitaire,
- Les anti-dérives augmentent la taille moyenne des gouttelettes pulvérisées afin d'améliorer leur placement vers la surface cible,
- Les anti-mousse limitent la formation de mousse lors de la vaporisation,
- Les épaississants augmentent la viscosité des formulations, la dérive des gouttelettes de spray peut être maîtrisée ainsi que leur évaporation une fois à la surface des végétaux. Ralentir l'évaporation est important dans le cas des phytosanitaires systémiques car ils pénètrent la cuticule tant qu'ils sont en solution.
- Les colorants, émétiques, répulsifs et antidotes sont ajoutés pour protéger l'utilisateur des risques d'intoxication

d- les différentes formulations

Il existe deux principaux types de formulations :

- les formulations liquides : concentrés émulsifiables, solutions, émulsions inverses, suspensions concentrées, aérosols, appâts liquides (insecticides, rodenticides);
- les formulations sèches ou solides : poudres fines, poudres de repérage (rongeurs), appâts (animaux nuisibles vertébrés), pâtes, gels et appâts injectables, granulés, pastilles, poudres mouillables, poudres solubles, granulés dispersibles dans l'eau.

D'autres présentations existent : les microencapsulations, les sachets hydrosolubles, les substances attractives (phéromones), les substances d'imprégnation (colliers antiparasitaires...), les répulsifs (aérosols, lotions), les antiparasitaires pour animaux domestiques (injections orales, spots-on, poudres, aérosols) et les fumigènes.

En règle générale, un phytosanitaire commercial est identifié par le nom de la spécialité et un code international à deux lettres majuscules identifiant le type de formulation (Figure I-15).

A – Aerosol	G – Granules	ULV – Ultra low volume
AF – Aqueous flowable	GL – Gel	ULW – Ultra low weight or ultra low wettable
AS – Aqueous solution or aqueous suspension	L – Liquid (flowable)	W – Wettable powder
B – Bait	LC – Liquid concentrate or low concentrate	WDG – Water-dispersible granules
C – Concentrate	LV – Low volatile	WP – Wettable powder
CM – Concentrate mixture	M – Microencapsulated	WS – Water soluble
CG – Concentrate granules	MTF – Multiple temperature formulation	WSG – Water-soluble granules
D – Dust	P – Pellets	WSL – Water-soluble liquid
DF – Dry flowables	PS – Pellets	WSP – Water-soluble powder or water-soluble packet
DS – Soluble dust	RTU – Ready-to-use	
E – Emulsifiable concentrate	S – Solution	
EC – Emulsifiable concentrate	SD – Soluble dust	
F – Flowable (liquid)	SG – Soluble granule	
	SP – Soluble powder or soluble packet	

Figure I-15 : Codes internationaux pour l'identification du type de formulation des phytosanitaires d'après Herzfeld et Sargent 2011 [42]

1. 6. 3. Les indices de fréquence de traitement des pommes

a- Définitions

L'indice de fréquence de traitement (IFT) est un indicateur d'origine danoise qui a été retravaillé pour la France par l'INRA et le Ministère de l'Agriculture et de la Pêche afin de pouvoir évaluer l'utilisation des produits phytosanitaires dans les cultures en France. Cet indicateur doit permettre de suivre la baisse des utilisations de ces produits, prévue par le plan Ecophyto 2018 (Brunet *et al.* 2008 [51]).

En France, l'IFT correspond au nombre de doses homologuées (DH) appliquées sur un hectare pendant une année de campagne culturale. La DH est la dose efficace d'application d'un produit sur une culture et pour un organisme cible donnés. Les DH sont consultables en ligne sur e-phy.agriculture.gouv.fr (Figure I-16).

	Dose	Unité	Usage
	0.050	KG/HL	Pommier*Trt Part.Aer.*Maladies du feuillage
	0.050	KG/HL	Pommier*Trt Part.Aer.*Maladies précoces des fruits
	0.050	KG/HL	Pommier*Trt Part.Aer.*Tavelure(s)

Figure I-16 : Informations types disponibles sur la base de données gouvernementale (Exemple d'un fongicide : le dithianon (spécialité commerciale Delan WG)

L'IFT peut être calculé pour une parcelle, une exploitation, un département, une région ou un pays, pour une culture en particulier ou pour un ensemble de cultures.

Dans le cas de plusieurs traitements, il est calculé selon l'équation (1) :

$$IFT(\text{parcelle}) = \sum_T \left[\frac{DA_T}{DH_T} \times PP_T \right] \quad (1)$$

dans laquelle

T : Traitement

DA : dose appliquée par hectare

DH : dose homologuée par hectare

PP : proportion de la parcelle traitée (si celle-ci n'est pas traitée dans sa totalité)

Pour une exploitation contenant plusieurs parcelles, il correspond à la somme des IFT des parcelles pondérées par la surface de ces parcelles (Equation (2)) :

$$IFT(\text{exploitation}) = \frac{\sum(IFT \text{ parcelles} \times \text{surfaces traitées})}{\sum \text{surfaces parcelles}} \quad (2)$$

On peut distinguer l'IFT herbicide et l'IFT hors herbicide qui correspond aux traitements fongicides, insecticides et anti-limaces.

b-Indices de fréquence de traitement des pommes en France

En France, l'IFT moyen total calculé pour les cultures fruitières (Figure I-17) est le plus élevé bien que la superficie des vergers ne représente que 5 % des surfaces cultivées. Cette valeur reflète combien l'arboriculture est importante dans le paysage agricole français. Dans le cas des pommes, premier fruit consommé par les Français, les IFT peuvent atteindre des valeurs proches de 40, l'IFT des pommes de table en 2006 était de 36,5 (Butault *et al.* 2011 [52]).

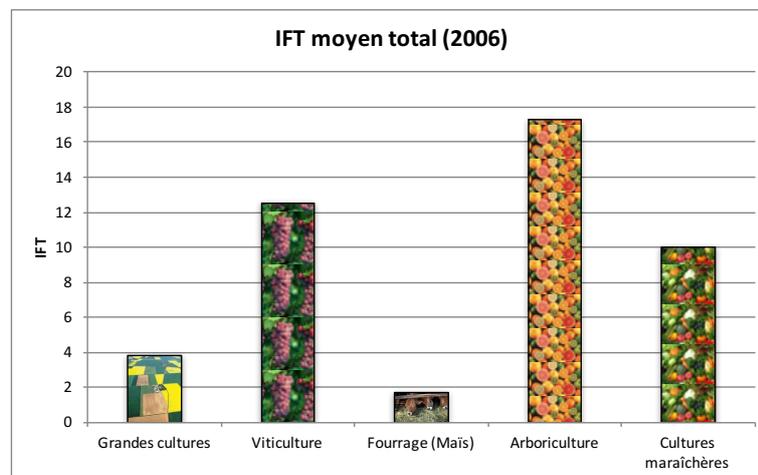


Figure I-17 : Représentation des IFT moyens totaux pour les principales cultures en France en 2006 d'après Butault *et al.* 2010 [53]

En 2011, les vergers de pommiers ont reçu en moyenne entre moins de 27 traitements et plus de 40 traitements (Tableau I-11).

64 % des traitements sont des antifongiques-antibactériens, 26 % des insecticides-acaricides, 5 % des herbicides et 5 % des régulateurs de croissance.

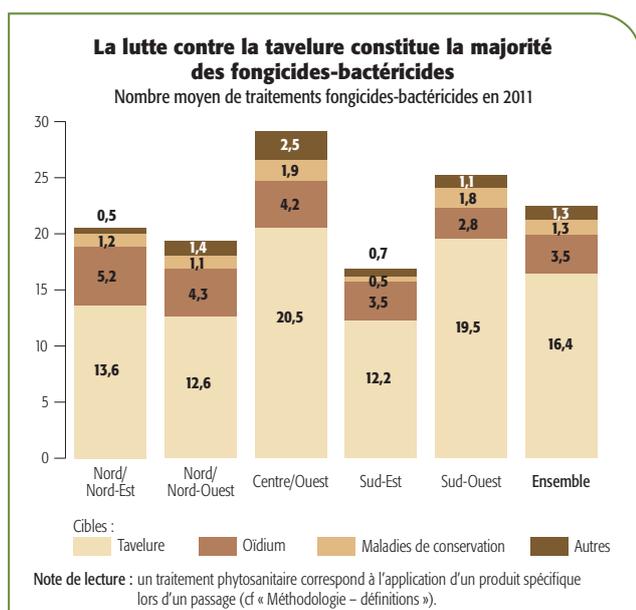
Plus de 25 fongicides-bactéricides dans les vergers de pommiers du Centre/Ouest et du Sud-Ouest						
Nombre moyen de traitements phytosanitaires en 2011						
	Bassins de production					Ensemble
	Nord/Nord-Est	Nord/Nord-Ouest	Centre/Ouest	Sud-Est	Sud-Ouest	
Fongicides – bactéricides	20,5	19,4	29,1	16,9	25,2	22,5
Insecticides – acaricides	5,6	4,8	9,9	8,6	9,9	9,0
Herbicides	1,9	1,4	2,3	1,0	2,6	1,8
Régulateurs de croissance	0,9	1,2	2,1	1,6	1,8	1,8
Ensemble des traitements phytosanitaires	28,9	26,8	43,4	28,1	39,5	35,1

Note de lecture : un traitement phytosanitaire correspond à l'application d'un produit spécifique lors d'un passage (cf. « Méthodologie – définitions »).

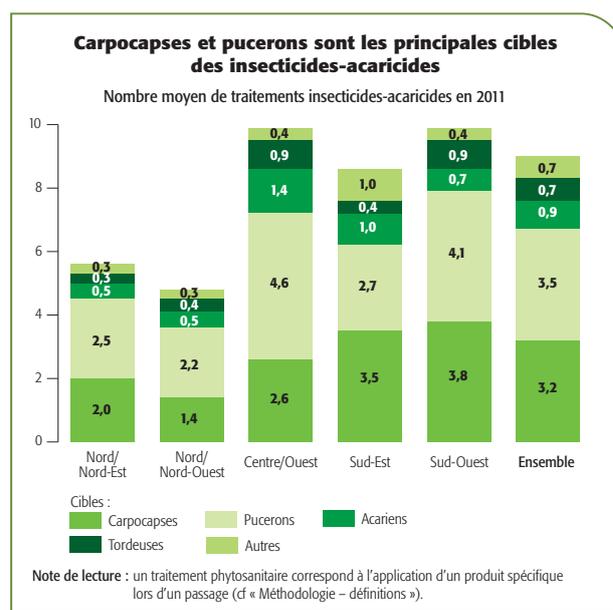
Source : SSP - Agreste – Enquête sur les pratiques phytosanitaires en arboriculture 2012

Tableau I-11 : Nombre moyen de traitements phytosanitaires appliqués sur les vergers de pommiers en France en 2011 d'après Agreste Primeur 2015 [54]

Le traitement de la tavelure représente plus de 70 % des traitements antifongiques appliqués sur les pommiers. Le risque est particulièrement présent dans les régions à pluviométrie plus marquée comme le Sud-Ouest et le Centre/Ouest. La lutte contre les carpocapses et les pucerons représente plus de 70 % des traitements insecticides utilisés. Les carpocapses attaquent particulièrement toute la région Sud tandis que les pucerons ciblent les pommiers vers l'Ouest du Centre au Sud ainsi que toute la région Centre (Figure I-18).



Source : SSP - Agreste – Enquête sur les pratiques phytosanitaires en arboriculture 2012



Source : SSP - Agreste – Enquête sur les pratiques phytosanitaires en arboriculture 2012

Figure I-18 : Répartition des traitements antifongiques et insecticides en France en 2011 d'après Agreste Primeur 2015 [54]

Les IFT mesurés en 2008 sur 72 exploitations (1606 ha de pommes = 40 % des surfaces) du Tarn et Garonne illustrent la répartition des traitements des vergers (Tableau I-12). Près de 98 % des traitements sont des traitements hors herbicides, dont près de 70 % de fongicides. Cinq fongicides regroupent à eux seuls 50 % des matières actives utilisées : dithianon 13 %, captane 13 %, mancozèbe 13 %, thirame 9 % et soufre 9 %).

Traitement	Tous	Hors herbicides	Herbicides	Fongicides	Insecticides + acaricides	Autres	Hors bio
IFT	45,62	44,49	1,13	31,3	10,14	3,05	40,86
%	100	97,5	2,5	68,6	22,2	6,7	89,6

Tableau I-12 : Répartition des IFT des pommiers dans le Tarn & Garonne en 2008 d'après consortium régional 2010 [55]

2. Une peau à la loupe

2.1. La structure de l'épiderme des pommes

L'épiderme des pommes est formé de 4 couches successives (Figure I-19) (Maguire 1998 [56]) :

- Les poils épidermiques (absents sur les pommes à maturité),
- La cuticule,
- L'épiderme,
- L'hypoderme.

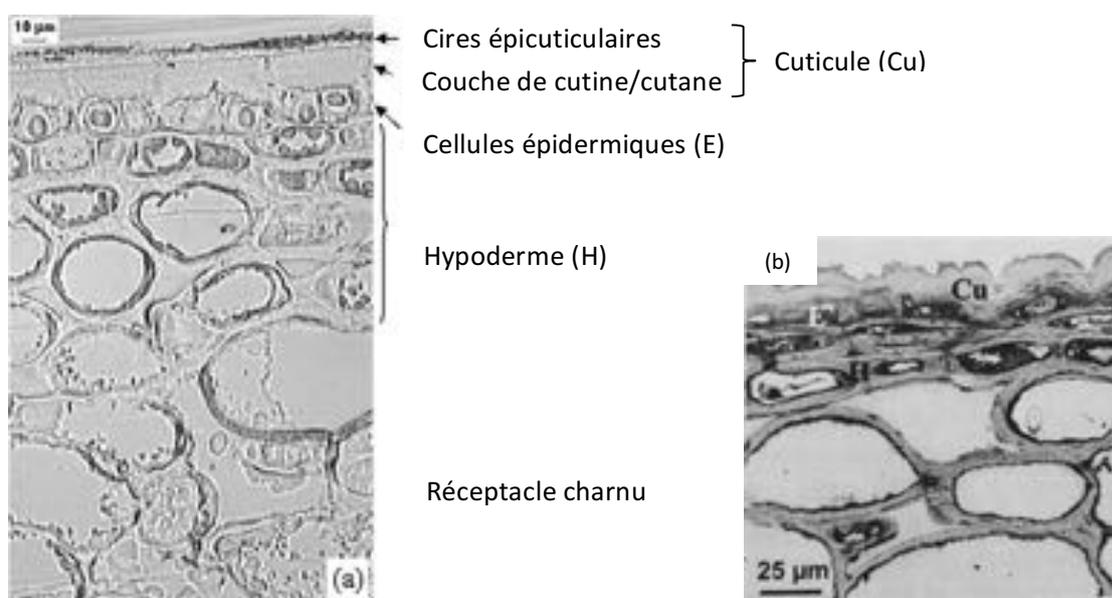


Figure I-19 : Coupe transversale d'épidermes de pomme Braeburn (a) observé au microscope Trino Topic T avec un objectif x10 d'après Schotsmans et al. 2004 [57] et de pomme Boskoop (b) observé au microscope Jenaval Contrast à 120 kV d'après Konarska 2012 [58]

De par leur composition cellulaire, l'épiderme et l'hypoderme ne constituent pas une barrière efficace et sont le siège de nombreux échanges. La cuticule (Figure I-20) est une couche extracellulaire complexe qui recouvre les feuilles, les tiges primaires, les fleurs, les pétioles, les fruits, les poils et les glands (Lendzian et Kerstiens 1991 [59]). En 1937, Bell a décrit la structure et la formation de la cuticule sur les pommes McIntosh. La cuticule est synthétisée par l'épiderme des fruits, des feuilles, des tiges primaires et des organes des fleurs (Pollard et al. 2008 [60]). Elle est déjà présente sur l'ovaire des fleurs au stade de pleine floraison. A ce stade, son épaisseur n'excède pas quelques microns pour atteindre au moment de la récolte une vingtaine de microns sur le fruit (Curry 2008 [61]). En tant que couche la plus externe de la peau des fruits à maturité, c'est une véritable barrière physico-chimique, empêchant notamment la déshydratation excessive des fruits et la perte

des solutés organiques et inorganiques, les protégeant des dommages mécaniques, des abrasions, de la pénétration des xénobiotiques (fertilisants, régulateurs de croissance, fongicides, insecticides et herbicides) et des rayons UV et des infections par des agents pathogènes (Szakiel *et al.* 2012 [62]). La cuticule est une surface légèrement perméable aux gaz et à la vapeur d'eau. Imperméable à l'eau, elle reste néanmoins mouillable. Les transferts d'eau sous forme liquide et vapeur obéissent à deux phénomènes : la diffusion à travers la membrane cuticulaire qui est régie par les cires (le transport de l'eau peut alors être déterminé par un coefficient de diffusion apparent global unique des cires) et la sorption à la surface qui dépend de la fraction polysaccharidique de la cutine et non pas directement des cires (Veraverbeke *et al.* 2003 [63], Dominguez *et al.* 2011 [64]).

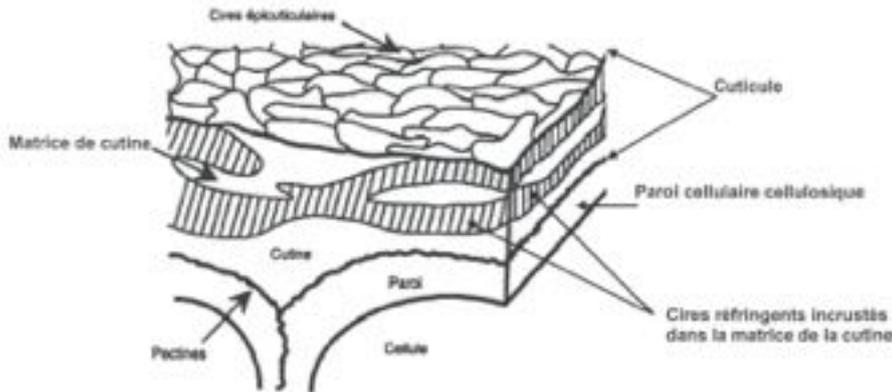


Figure I-20 : Schéma général de la cuticule épidermique d'après Ketata 2012 [65]

2. 2. Composition de la cuticule

L'analyse de l'ultrastructure de la cuticule des pommes montre que les cires épicuticulaires (EW) constituent la partie la plus externe et recouvrent une membrane complexe formée de deux parties distinctes : la cuticule propre (CP) et la couche cuticulaire (CL) (Figure I-21, a). La couche cuticulaire (CL) est subdivisée en deux niveaux, externe la plus proche de la cuticule (ECL) et interne la plus proche de l'épiderme (ICL) (Figure I-21, b et c).

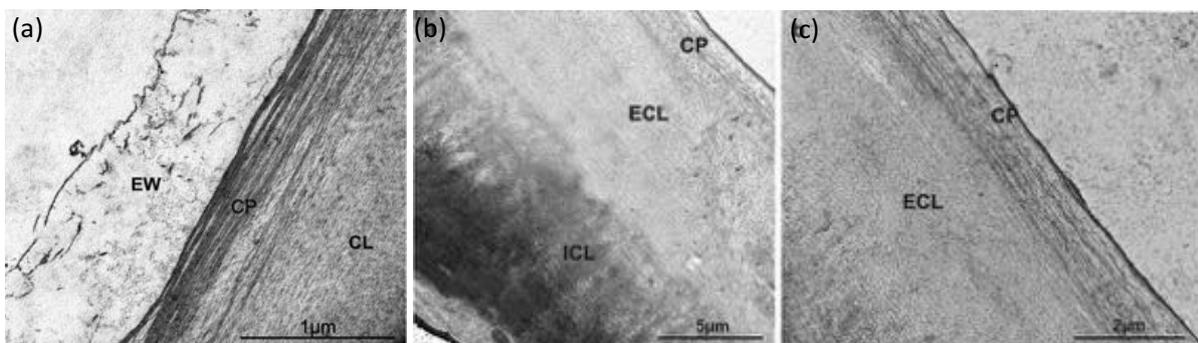


Figure I-21 : Analyse de l'ultrastructure des cuticules de pommes Ligol (a), Szampion (a) et Jonagold (b) au microscope électronique à transmission FEI Technai G2 Spirit Bio TWIN à 120kV d'après Konarska 2012 [58] et 2014 [66]

Légende : CP = cuticule propre

ECL = couche cuticulaire externe

ICL = couche cuticulaire interne

La cuticule propre est composée essentiellement de lipides, caractérisés par des solubilités différentes : la cutine dépolymérisable, le cutane insoluble et non dépolymérisable et les cires

intracuticulaires solubles (Pollard *et al.* 2008 [60]). Elle concentre les flavonoïdes présents dans la peau des fruits (Cf. §1. 7. 2.). Quant à la couche cuticulaire, elle pourrait contenir de la cutine et des polysaccharides de la paroi cellulaire (cellulose, hémicellulose, pectines) mais également des cires intracuticulaires (Pollard *et al.* 2008 [60], Dominguez *et al.* 2011 [64], Garrec *et al.* 1995 [67]).

2. 2. 1. La cutine

Les monomères de cutine sont de nature diverse : acides gras fonctionnalisés (groupements hydroxyle, époxyde) ou non, alcools gras, glycérol et composés phénoliques...(Figure I-22). Mais la plupart du temps, ce sont des acides gras C16 à C18 ω -hydroxylés, synthétisés à partir de l'acide oléique ou linoléique par des réactions d'hydroxylation et d'époxydation successives, catalysées par des enzymes de type cytochrome P450 ou des peroxygénases (Dugé de Bernonville 2009 [68], Molina 2010 [69]). La composition en C16 et C18 de la cutine varie selon les espèces végétales. Dans le cas de *Malus domestica*, le monomère majoritaire est l'acide tétrahydroxystéarique (Lara *et al.* 2015 [70]).

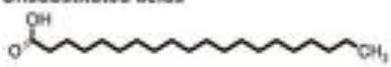
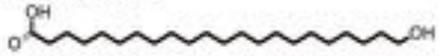
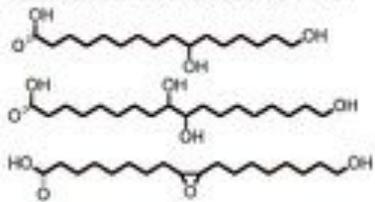
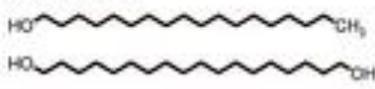
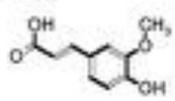
Monomer	Cutin
Glycerol 	Substantial
Unsubstituted acids 	Minor (C ₁₆ -C ₁₈)
α,ω -Dicarboxylic acids (C ₁₆ -C ₂₀) 	Minor ^b
ω -hydroxy acids 	Major (C ₁₆ -C ₁₈)
Substituted ω -hydroxy acids (C ₁₆ -C ₁₈) 	Major
Fatty alcohols 	Rare and minor (C ₁₆ -C ₁₈)
Ferulate 	Low

Figure I-22 : Les différents monomères de la cutine d'après Molina 2010 [69]

Légende : ^a selon Kolattukudi 2001

^b majoritaires (> 50 %) dans la cutine de *Arabidopsis* et *Brassica napus*

Des estérifications entre les fonctions alcools primaires et acides des monomères conduisent à la formation d'un polyester linéaire. Les chaînes linéaires contiennent souvent un groupe fonctionnel

oxygéné (époxy, oxo, hydroxy ou diol) en milieu de chaîne. Les fonctions hydroxyles secondaires (en milieu de chaîne) ou les fonctions hydroxyles provenant du glycérol peuvent s'estérifier avec les fonctions carboxyles d'autres monomères d'acides gras ω -hydroxylés pour former un polymère ramifié localement (Figure I-23) (Dugé de Bernonville 2009 [68], Molina 2010 [69]).

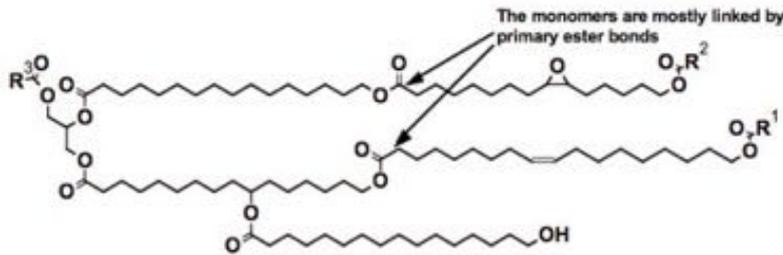


Figure I-23 : Structure possible d'un polymère de cutine riche en acides gras ω -hydroxylés d'après Molina 2010 [69]

La cutine est un biopolymère tridimensionnel, amorphe et flexible mais présentant une certaine rigidité liée à la réticulation. Il est insoluble dans les solvants polaires mais dépolymérisable par rupture des liaisons esters (Pollard *et al.* 2008 [60], Buschhaus et Jetter 2011 [71]). La structure n'est pas encore totalement élucidée : forme-t-elle un *continuum* à haut degré de polymérisation ou bien existe-t-il une répartition de polymères de poids moléculaires inconnus ? Heredia *et al.* en 2000 [72] ont proposé une modélisation de la structure probable d'une section du polymère de cutine (Figure I-24, b), en tenant compte des caractéristiques moléculaires principales des divers polymères existant parmi les végétaux :

- l'inter-estérification des monomères d'acides en C16 et C18 :1 hydroxylés et hydroxy-époxylés, et en particulier les acides 9,16-dihydroxyhexadécanoïques (Figure I-24, a),
- l'existence de groupes hydroxyles secondaires non estérifiés (la moitié environ des groupes hydroxyles situés au milieu des chaînes sont impliquées dans les liaisons esters alors qu'il ne reste que peu de groupes carboxyles non estérifiés),
- la structure tridimensionnelle amorphe.

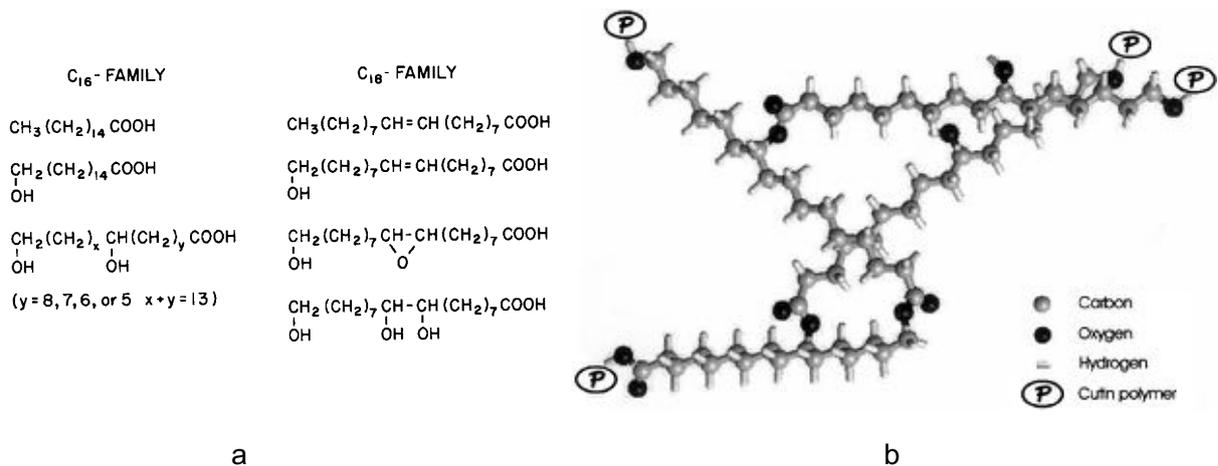


Figure I-24 : Structure modélisée d'une section de polymère de cutine d'après Heredia *et al.* 2000 [72]

2. 2. 2 Le cutane

Lorsque la cuticule est correctement et suffisamment isolée, délipidée et dépolymérisée (rupture des liaisons esters), il reste un résidu insoluble, amorphe et non dépolymérisable appelé cutane s'il est riche en composés aliphatiques. Il est probablement constitué de composés aliphatiques liés par des liaisons éther et par des liaisons C-C. Il contient également des polysaccharides de la paroi cellulaire et des aromatiques. Quant à la biosynthèse du cutane, elle reste une énigme. Le précurseur privilégié semble être l'acide linoléique (Pollard *et al.* 2008 [60]).

Les taux de cutine et de cutane sont très variables selon les espèces : le taux de cutine peut être supérieur, inférieur ou égal à celui du cutane. Dans le cas des pommes, le taux de cutane est faible, de l'ordre de 3-7 % en masse de la cuticule tandis que la cutine représente 36% (Chen *et al.* 2008 [73], Johnson *et al.* 2007 [74]).

2. 2. 3. Les lipides cuticulaires solubles

La particularité des lipides cuticulaires est qu'ils se dispersent dans toute l'épaisseur de la cuticule (Maguire 1998 [56], Heredia 2003 [75]) :

- une partie déposée à sa surface externe – les cires épicuticulaires ,
- une autre partie imprégnant la matrice polymérique de cutine – les cires intracuticulaires.

a- Composition chimique générale des cires cuticulaires des végétaux

Contrairement aux monomères plutôt courts (C16-C18) de la cutine, les cires sont des molécules apolaires saturées à très longue chaîne C24-C36 parmi lesquelles alcanes, alcools primaires et secondaires, aldéhydes, cétones, esters, β -dicétones et leurs dérivés représentent les composés les plus classiques, des terpénoïdes, des flavonoïdes et des stérols ainsi que des composés plus atypiques (Tableau I-13) (Pollard *et al.* 2008 [60], Szakiel *et al.* 2012 [62], Buschhaus et Jetter 2011 [71], Shepherd et Griffiths 2006 [76], Bianchi 1995 [77]).

Composés	Formules brutes	Nombres de carbones	Composés majoritaires
n-alcane	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x\text{CH}_3$	C21-C35 impairs	C27, C29, C31
Esters n-alkyliques	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x\text{COO}(\text{CH}_2)_y\text{CH}_3$	C34-C62 pairs	C40, C50
Acides n-carboxyliques	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x\text{COOH}$	C16-C32 pairs	C22, C24, C26, C28
Alcools primaires	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x\text{CH}_2\text{OH}$	C22-C32 pairs	C26, C28, C30, C32
Aldéhydes	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x\text{CHO}$	C22-C32 pairs	C26, C28, C30, C32
Cétones	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x\text{CO}(\text{CH}_2)_y\text{CH}_3$	C23-C33 impairs	C29, C31
Alcools secondaires	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x\text{CHOH}(\text{CH}_2)_y\text{CH}_3$	C23-C33 impairs	C29, C31
Béta-dicétones	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x\text{COCH}_2\text{CO}(\text{CH}_2)_y\text{CH}_3$	C27-C33 impairs	C31, C33
Hydroxy-béta-dicétones	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x\text{COCH}_2\text{CO}(\text{CH}_2)_y\text{CHOH}(\text{CH}_2)_z\text{CH}_3$	C27-C33 impairs	C31, C33
Oxo-béta-dicétones	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x\text{CO}\cdot\text{CH}_2\text{CO}(\text{CH}_2)_y\text{CO}(\text{CH}_2)_z\text{CH}_3$	C29-C31 impairs	C31
Alcools			Stérois, alpha-amyrine, bêta-amyrine, lupéol, uvaol, érythridiol
Acides			Acides ursolique, oléanique, dihydroxytriterpéniques
Esters			Esters stéryliques, acétate de bêta-amyrényle, acétate de taraxéryle, acétate de lupeyle
Cétones et aldéhydes			Taraxérone, lupén-3-one, oléanén-3-ol, ursén-3-one
Triterpènes			
tétracycliques			
pentacycliques			
Alcane ramifiés	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2)_y\text{CH}_3$	C25-C35 pairs et impairs C14-C34 pairs	
1-alcènes	$\text{CH}_2=\text{CH}(\text{CH}_2)_x\text{CH}_3$	C17-C23 impairs C20 pairs	
Hydrocarbures terpéniques			
Acides oméga-hydroxycarboxyliques	$\text{HO}-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_x\text{COOH}$	C20-C32 pairs	
Hydroxycétones	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x\text{CHOHCO}(\text{CH}_2)_y\text{CH}_3$	C25-C33 impairs	
Acides ramifiés	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2)_y\text{COOH}$	C25-C31 impairs	
Esters ramifiés	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x\text{COOCH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2)_y\text{CH}_3$	C31-C37 impairs	
Esters méthyliques et éthylphényliques	$\text{C}_6\text{H}_5(\text{CH}_2)_x\text{OCO}(\text{CH}_2)_y\text{CH}_3$	C26-C30 pairs	
Acides et esters benzoïques	$\text{C}_6\text{H}_5\text{COO}(\text{CH}_2)_x\text{CH}_3$	C22-C26 pairs	
Acétates	$\text{CH}_3\text{COO}(\text{CH}_2)_x\text{CH}_3$	C24-C3 pairs	
Diesters	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x(\text{COO}(\text{CH}_2)_y\text{CO}(\text{CH}_2)_z\text{CH}_3)$		
Composés flavonoïdes			phénoliques dont

Tableau I-13 Liste des composés chimiques contenus dans les cires cuticulaires des végétaux d'après Bianchi 1995 [77]

b- Composition des cires totales des pommes

La composition des cires extraites après isolement des cuticules est évaluée par un procédé complexe utilisant plusieurs solvants et des recristallisations ou bien par Soxhlet avec un mélange chloroforme / méthanol le plus couramment (Cf. § 2. 3. 1.).

Les pommes sont très riches en cires, en moyenne plus de 40% massique de la cuticule (Chen *et al.* 2008 [73], Johnson *et al.* 2007 [74]).

Les procédés d'extraction ou de séparation donnent lieu à diverses fractions identifiées comme cire solide, cire liquide, acide ursolique et cutine (Bonnier 1963 [78], Morozova et Sal'kova 1966 [79]). Bonnier référence dans la revue générale de Botanique les composés identifiés dans chaque fraction de cire solide et liquide (Tableau I-14) (Bonnier 1963 [78]).

Composés	Nombre de carbones	% dans cire solide	% cire liquide
n-alcanes	C15-C23 pairs et impairs	43 % (C25, C27, C29, C31, C33)	23,5 % (C15-C29 pairs et impairs)
Alcools primaires	C16-C30 pairs	20,5 % (C16-C30 pairs)	17,7 % (C16-C30 pairs)
Alcools secondaires	C29	Non renseigné	0 %
Diols	C20-C28 pairs et impairs (C21)	1-5 %	0 %
Acides n-carboxyliques saturés	C6-C30 pairs et impair (C7)	14,8 % (C14-C24 pairs)	14 % (C6-C24 pairs et impairs)
Acides n-carboxyliques insaturés	C16 :1, C18 :1, C18 :2, C18 :3	4,9 % (C18 :1, C18 :2)	43 % (C16 :1, C18 :1, C18 :2, C18 :3)
Hydroxyacides	-	12 %	0 % ?
Acide ursolique	-	Non renseigné	0 %

Tableau I-14 : Composés identifiés dans les cires solides et liquides des cuticules de pommes d'après Bianchi 1995 [77]

Morozova et Sal'kova en 1966 [79] ont mesuré un taux d'acide ursolique très élevé de 28 à 40 % en masse de cuticule pour deux variétés de pommes, Antonovka et Slavyanka .

Fernandes *et al.* en 1964 [80] ont évalué la composition chimique des cires cuticulaires de fruits jeunes et matures de trois variétés de pommes Bramley, Cox et Worcester. L'acide ursolique est le composé majoritaire des cires des jeunes pommes : entre 57 et 61 %. Les taux d'alcanes et d'esters sont respectivement compris entre 15-16 % et 11-18 %. Les alcools et les cétones varient entre 7 et 9%. Les acides libres sont les plus faibles, de 3 à 6 %. Une analyse des cires épicuticulaires et intracuticulaires des pommes Bramley matures a montré que l'acide ursolique reste majoritaire et qu'il se trouve essentiellement dans les cires intracuticulaires (35 % et 58 % respectivement).

Depuis l'étude de Belding *et al.* de 1998 [81], la pomme est citée comme source d'acide ursolique, à l'origine de multiples propriétés, notamment anticancérigènes. La peau des pommes possède un fort pouvoir antioxydant (Szakiel 2012 [62]).

D'autres triterpènes ont été également identifiés dans l'épiderme des pommes (Tableau I-15).

Fruit	Triterpénoïdes identifiés	Références
Pomme (<i>Malus domestica</i> Mill.)	Acide euscaphique ; acide 2a,3a-dihydroxy-olean-12-en-28-oïque ; acide 2a,3a-dihydroxy-urs-12-en-28-oïque ; acide 2a-hydroxyursolique ; acide ursolique, uvaol.	Szakiel 2012 [62]
Pomme (<i>Malus domestica</i> Borkh.) cv. Holsteiner Cox	Acide oléanolique ; acide ursolique ; uvaol.	
Pomme (<i>Malus domestica</i> Mill.) cv. Red Delicious	Acide 3b-cis-p-coumaroyloxy-2a-hydroxyoléan-12-en-28-oïque ; acide 3b-cis-p-coumaroyloxy-2a-hydroxyurs-12-en-28-oïque ; 3b,28-dihydroxy-12-ursène ; 3b,13b-dihydroxyurs-11-en-28-oïque ; acide 2a-hydroxy-3b-[(2Z)-3-phenyl-1-oxo-2-propenyl]oxyoléan-12-en-28-oïque ; acide 2a-hydroxyursolique ; acide maslinique ; acide 3b-trans-cinnamoyloxy-2a-hydroxyurs-12-en-28-oïque ; acide 3b-trans-p-cinnamoyloxy-2a-hydroxyoléan-12-en-28-oïque ; acide 3b-trans-p-coumaroyloxy-2a-hydroxyoléan-12-en-28-oïque ; acide 3b-trans-p-coumaroyloxy-2a-hydroxyurs-12-en-28-oïque ; acide 2a,3b,13b-trihydroxyurs-11-en-28-oïque ; acide ursolique.	
7 cultivars : Braeburn, Granny Smith, Fuji, Envy, Pink Lady, Pacific Rose, Red Field	Acide dihydroxy-urs-12-en-28-oïque ; acide trihydroxy-urs-12-en-28-oïque ; acide tétrahydroxy-urs-12-en-28-oïque ; acide 3-oxo-1,19 α -dihydroxy-urs-12-en-28-oïque (acide annurcoïque) ; acide 3-oxo-1 α -hydroxy-urs-12-en-28-oïque (acide pomonique) ; acide 3 β -p-coumaroyloxy-dihydroxy-urs-12-en-28-oïque ; acide 3 β ,19 α -dihydroxy-urs-12-en-28-oïque (acide pomolique) ; acide 3-oxo-hydroxy-urs-12-en-28-oïque ; acide dihydroxy-urs-12-en-28-oïque ; acide dihydroxy-urs-12-en-28-oïque ; acide 3 β -trans-p-coumaroyloxy-2 α ,13 β -dihydroxy-urs-12-en-28-oïque ; acide 3 β -cis-p-coumaroyloxy-2 α ,13 β -dihydroxy-urs-12-en-28-oïque ; acide dihydroxy-urs-12-en-28-oïque ; acide 3 β -trans-p-coumaroyloxy-2 α ,13 β -dihydroxy-urs-12-en-28-oïque ; acide dihydroxy-urs-12-en-28-oïque ; acide oxo-urs-12-en-28-oïque ; inconnu (acide dihydroxy-urs-12-en-28-oïque) ; acide oxo-urs-12-en-28-oïque ; acide 3-oxo-hydroxy-urs-12-en-28-oïque ; acide 3-oxo-hydroxy-urs-12-en-28-oïque ; acide 3 β -p-coumaroyloxy-hydroxy-urs-12-en-28-oïque ; acide 3 β -trans-p-coumaroyloxy-2 α -hydroxy-urs-12-en-28-oïque ; acide 3 β -cis-p-coumaroyloxy-2 α -hydroxy-urs-12-en-28-oïque ; acide oxo-urs-12-en-28-oïque ; acide 3 β -hydroxy-lup-20(29)-en-28-oïque (acide bétulinique) ; acide 3 β -hydroxy-urs-12-en-28-oïque (acide ursolique) ; 3 β -hydroxy-urs-12-en-28-ol (uvaol).	McGhie <i>et al.</i> 2012 [36]

Tableau I-15 : Triterpénoïdes identifiés dans les cires cuticulaires de pommes

Dong *et al.* ont identifié dans les cires de Red Fuji immatures extraites par immersion aux US dans un mélange chloroforme/méthanol (3 :1) deux fractions de composés (Dong *et al.* 2012 [82]) :

- des composés apolaires (alcanes C21-C31 dont 95 % de C29 et 1,6 % de C27),
- des composés polaires (acides gras C14-C28 dont 17 % de C16 :0 et nonacosan-10-one 16 % et nonacosan-10-ol 29 %).

Le nonacosane (C29) et l'acide ursolique sont les composés majoritaires des cires de *Malus domestica* (Lara *et al.* 2015 [70]).

Des stérols ont également été identifiés : β -sitostérol dans les variétés Florina, Golden B et Ozark Gold ainsi que deux stéroïdes dans la variété Annurca (Szakiel 2012 [62], Verardo *et al.* 2003 [83]).

Certains composés phénoliques, dont les flavonoïdes, sont abondants dans la peau des pommes (Cf. § 1. 5. 2.).

c- Différenciation chimique des cires cuticulaires et de leurs cristaux

Après extraction sélective (cryo-adhésifs et films de gomme arabique) et analyse des cires intra et épicuticulaires des feuilles de 20 végétaux différents, Buscchaus et Jetter en 2011 [71] partitionnent les composés chimiques des cires de la façon suivante :

- les composés cycliques tels que les triterpènes, les stéroïdes, les aromatiques et les alkyrésorcinols se concentrent presque exclusivement dans la partie intracuticulaire. Les alcools primaires, les diols et les composés aliphatiques à longue chaîne ont tendance à se concentrer à de plus forts pourcentages dans la partie intracuticulaire également.
- Les acides gras libres, les alcanes et les alcools secondaires à très longue chaîne s'accumulent le plus souvent dans la partie épicuticulaire.
- Aucune tendance n'est observée pour les aldéhydes et les esters à très longue chaîne.
- Aucune tendance n'est observée quant à la distribution, fondée sur la longueur des chaînes, des composés aliphatiques à très longue chaîne.

Le mécanisme à la base de cette partition reste encore à élucider mais il doit faire appel, au moins en partie, aux propriétés physico-chimiques des composés des cires et à leurs interactions avec les polymères de la cuticule (Buscchaus et Jetter 2011 [71], Jetter et Schäffer 2001 [84]). Dans leurs travaux de 2000 sur les feuilles de *P. laurocerasus*, Jetter *et al.* ont les premiers démontré que la partition reposait essentiellement sur les diffusions distinctes des molécules à travers la cuticule, des bioaccumulations pour réguler la synthèse des cires et des translocations de composés des cires épicuticulaires vers les cires intracuticulaires où ils pourront être ultérieurement métabolisés (Jetter et Schäffer 2001 [84], Jetter *et al.* 2000 [85]). Pour Riedel *et al.*, il existe aussi des gradients chimiques distincts entre les deux catégories de cires de la cuticule, comme c'est le cas des aldéhydes notamment. Ils ont identifié une très grande quantité de n-aldéhydes dans les cires cuticulaires d'espèces du genre *Nepenthes*. Les cristaux caractéristiques en plaquettes qu'ils ont isolés dans la couche épicuticulaire sont très riches en aldéhydes (C30/C32) mais pauvres en alcools primaires et en esters alkyliques tandis que les cires intracuticulaires contiennent plus d'alcools primaires et d'esters alkyliques mais peu d'aldéhydes. Les composés sont également plus longs (C30, C32) dans les cires épicuticulaires que dans les cires intracuticulaires (C24, C26) (Riedel *et al.* 2003 [86] et 2007 [87]). La structure cristalline des cires est corrélée à leur composition chimique (Barthlott *et al.* 1998 [88], Jetter et Riederer 1995 [89]). Les travaux de Riedel *et al.* en 2003 sur *Nepenthes alata* [86] et en 2007 sur 5 espèces et hybrides du genre *Nepenthes* [87] démontrent que la formation des cristaux de cires est la conséquence d'une séparation de phase spontanée entre un composé dont la concentration a dépassé un seuil et le mélange de cires amorphes. La composition chimique est alors différente entre les cristaux et les cires environnantes. Bien avant l'apparition des méthodes d'isolement sélectif des différentes couches de cires, plusieurs études ont avancé l'idée que la prédominance d'alcools

secondaires (nonacosan-10-ol) ou de β -dicétones était responsable de la formation de cristaux en forme de tubules (Jetter et Riederer 1995 [89]). Les travaux de Wen *et al.* en 2006 [90] ont confirmé cette hypothèse selon laquelle la formation des tubules de cires épicuticulaires est la conséquence d'une séparation de phases spontanée sous l'impulsion d'une accumulation d'alcools secondaires dans les couches les plus externes des végétaux (augmentation significative de la concentration en nonacosan-10-ol notamment dans les nanotubules des cires épicuticulaires des aiguilles de *Taxus baccata*). Wen *et al.* observent également que les composés polaires s'accumulent préférentiellement dans les cires intracuticulaires (alcools primaires et acides gras à courtes chaînes).

d- Composition des cires épicuticulaires

Les cires épicuticulaires correspondent aux cires extraites soit mécaniquement (« stripping »), soit par immersion durant quelques secondes des fruits entiers dans un solvant plutôt apolaire comme l'hexane. L'extrait est ensuite séparé (chromatographie sur colonne, extractions liquide-liquide) afin d'identifier chaque famille de molécules (Cf. § 2. 3. 1.).

Verardo *et al.* en 2003 [83] ont extrait à l'hexane les cires externes de trois variétés de pommes Florina, Golden B et Ozark Gold. Ils ont identifié majoritairement des hydrocarbures (> 96 % d'alcane et < 4 % d'alcènes), des esters et aldéhydes, des acides gras libres et des alcools primaires. La proportion d'alcools secondaires dans les extraits est très variable de 0% dans la Golden B à 23 % dans la Florina. Les stérols sont très faibles < 1 %. Les résultats figurent dans le Tableau I-16.

Belding *et al.* en 1998 [81] ont extrait les cires épicuticulaires au chloroforme (trois immersions successives de 30 secondes de 15 pommes, de trois variétés de *Delicious* et de trois variétés de *Golden Delicious*, triplicats). Entre 47 et 72 % massique d'acide ursolique et isomère ont été identifiés, suivi de 19 à 36 % d'alcane (Nonacosane...), de 1 à 23 % d'alcools secondaires), de 0 à 9 % d'alcools primaires (Tétracosanol, hexacosanol, octacosanol...), de 0 à 1,7 % de cétones et enfin de 0 à 0,7 % d'aldéhydes. Dans une seconde expérience, ils extraient 732,4 μg de cires épicuticulaires par cm^2 de pommes Royal Gala et identifient leur composition moyenne : 32 % d'acide ursolique, 49 % d'alcane linéaires, 13 % d'alcools primaires et 2,4 % d'alcools secondaires, 1,6 % de cétones et 0,7 % d'aldéhydes.

Molécules	Variété	FLORINA	GOLDEN B	OZARK GOLD
Hydrocarbures	% massique dans la cire	29	41	41
	C majoritaires / alcanes	C29 et C27		
	C majoritaires / alcènes	C28 :1 et C26 :1		
Esters + aldéhydes	% massique dans la cire	18	22	21
	C majoritaires / esters	C40, C42 et C44		
	C majoritaires / acides estérifiés	C16 et C18		
	C majoritaires / alcools estérifiés	C18, C20, C22, C24 et C26		
	C majoritaires / aldéhydes	C30 et C28		
Alcools secondaires	% massique dans la cire	23	0	4,8
	C majoritaires	C29		
Alcools primaires	% massique dans la cire	13	16	13
	C majoritaires	C26, C28, C30	C24, C26, C28	C24, C26, C28
Stérols	% massique dans la cire	0,9	0,3	0,3
	C majoritaires			
Acides gras libres	% massique dans la cire	16	20	21
	C majoritaires	C16, C18, C18 :1, C20 et C22		

Tableau I-16 : Composition chimique des cires épicuticulaires extraites à l'hexane de trois variétés de pommes d'après Verardo et al. 2003 [83]

e- Composition des cires intracuticulaires

Les cires intracuticulaires correspondent aux cires extraites après l'élimination des cires épicuticulaires soit par solvant sélectif soit par un procédé mécanique ou de cryo-fixation.

De cette manière, les triterpénoïdes pentacycliques tels que l'acide ursolique ont été presque exclusivement localisés dans les cires intracuticulaires (Buschhaus et Jetter 2011 [71], Jetter et Schäffer 2001 [84]). Presque exclusivement car, dans le genre *Macaranga*, les triterpénoïdes se distribuent entre les cires épi et intracuticulaires. Le chloroforme, utilisé par Belding *et al.* en 1998 [81] pour extraire les cires épicuticulaires, a solubilisé l'acide ursolique des cires intracuticulaires. Cet exemple illustre bien le manque de sélectivité d'une immersion dans un solvant. Des analyses par RMN ¹³C CP-MAS des cuticules de kaki ont établi qu'il existait une interaction très grande entre les triterpénoïdes et la cutine (distance comprise entre moins de 20 nm à 24 nm). Les triterpénoïdes sont totalement intégrés dans la matrice de cutine dans un arrangement faiblement ordonné, avec laquelle ils interagissent très fortement. En revanche, la cutine n'a que peu d'interactions avec les composés aliphatiques à longues chaînes qui sont localisés à la périphérie du réseau tridimensionnel de cutine. L'analogie avec la cuticule de pomme tient au fait que les spectres des cuticules des deux fruits sont assez similaires, mettant en exergue la forte proportion de triterpénoïdes dans les cires (Tsubaki *et al.* 2013 [91]).

Les ursanes, oléananes et lupanes (Tableau I-17) dont les structures sont les plus importantes sur le plan biologique (anti-inflammatoires non stéroïdiens, antioxydants, antimicrobiens, antimycotiques,

virostatiques, toniques, hémolytiques, cytostatiques, immunomodulateurs, hépatoprotecteurs...) ont été identifiés dans des extraits de coproduits issus de l'industrie de transformation de la pomme (Grigoras 2012 [92]).

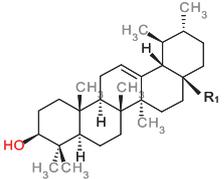
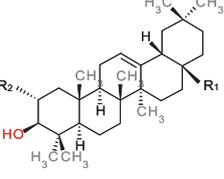
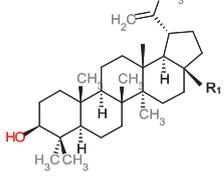
Classe de triterpènes	Structure chimique	Exemples
Ursane		R ₁ = CH ₃ : α-amyrine R ₁ = CH ₂ OH : Uvaol R ₁ = COOH : Acide ursolique
Oléanane		R ₁ = CH ₃ ; R ₂ = H : β-amyrine R ₁ = CH ₂ OH; R ₂ = H : Erythrodiol R ₁ = COOH; R ₂ = H : Acide oléanolique R ₁ = COOH; R ₂ = OH : Acide maslinique
Lupane		R ₁ = CH ₃ : Lupéol R ₁ = CH ₂ OH : Bétuline R ₁ = COOH : Acide bétulinique

Tableau I-17 : Structures des principales classes de triterpénoïdes pentacycliques identifiés dans les cires de pommes d'après Grigoras 2012 [92]

En 2008, Frighetto *et al.* [93] isolent l'acide ursolique de peaux de pommes Fuji, Gala, Smith et Granny Smith. Les cires épicuticulaires sont éliminées après immersion de 2 minutes dans l'hexane. L'extrait est analysé par chromatographie sur couche mince (CCM) afin de vérifier l'absence d'acide ursolique. Les pommes sont ensuite immergées pendant 15 heures dans 4 solvants différents : éthanol à 96 %, chloroforme, dichlorométhane ou acétate d'éthyle. Selon les variétés et les solvants utilisés, jusqu'à 2 g d'acide ursolique ont pu être extraits sur 20 pommes pour chaque variété. Le choix du solvant d'immersion doit répondre à un équilibre entre sélectivité et extraction exhaustive. En effet, l'éthanol permet une extraction quasi-exhaustive de l'acide ursolique tandis que l'acétate d'éthyle et les solvants chlorés sont plus sélectifs mais incapables d'épuiser la peau en acide ursolique.

2. 2. 4. Facteurs influençant la cuticule et ses cires

Intrinsèquement liées à la cuticule, les cires cuticulaires des pommes sont soumises à de nombreux facteurs :

- biotiques tels que la génétique (variété), l'arbre (nature du porte-greffe, santé, coupe), la nature de l'organe, le stade de développement du fruit (taille, maturité à la récolte)...
- abiotiques tels que les facteurs topographiques (lieu géographique, altitude, exposition aux UV), les facteurs climatiques (humidité, température, microclimats), les nutriments (qualité de l'eau, irrigation, nutrition de l'arbre et des fruits), les facteurs chimiques (pluies acides, tensioactifs, xénobiotiques tels que pesticides appliqués sur le feuillage et les fruits), les particules qui s'accumulent à la surface des feuilles et des fruits (poussières, sels) ainsi que les conditions de stockage (humidité, température, composition de

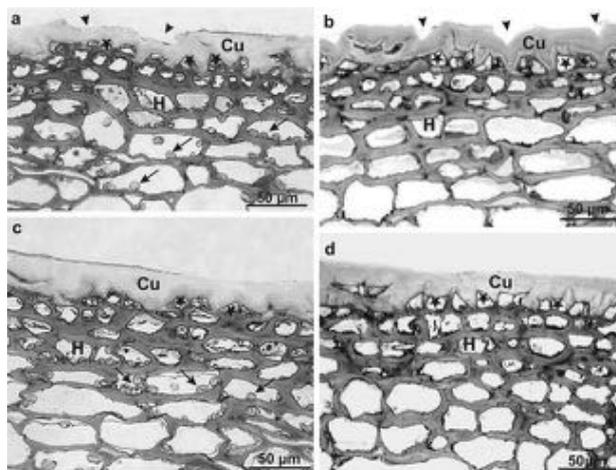
l'atmosphère / oxygène...) (Curry 2008 [61], Szakiel 2012 [62], Shepherd et Griffiths 2006 [76], Curry 2003 [94]). De façon importante, certains de ces facteurs peuvent aussi bien favoriser le développement de la cuticule que l'inhiber (Curry 2003 [94], 2001 [95]). L'acide trichloroacétique, par exemple, est un inhibiteur de la biosynthèse des cires cuticulaires (Garrec *et al.* [67]).

La biosynthèse, la structure, la quantité, la composition chimique et la fonction des cires épicuticulaires varient ainsi d'un cultivar à l'autre mais également tout au long de la vie du fruit, depuis son développement jusqu'à sa cueillette et sa conservation.

Les cires sont synthétisées régulièrement, dès l'exposition du bourgeon jusqu'à la sénescence du fruit. La cuticule serait formée par la décomposition enzymatique des cires et son épaisseur augmenterait ainsi graduellement au cours du temps (Curry 2001 [95]). Tessmer *et al.* en 2012 [34] observent au MEB la surface des pommes Gala et Galaxy récoltées au Brésil à 3 altitudes différentes. La cuticule des pommes Gala est plus épaisse sur les cultivars de haute altitude, confirmant ainsi les résultats antérieurs de Zhang (1983) et Xing-Jun *et al.* (2004) : de 18 à plus de 20 μm lorsque l'altitude est multipliée par 1,4. Tandis que l'altitude n'induit aucune différence sur la structure des cires après cueillette des fruits, les conditions de conservation (atmosphère normale et atmosphère contrôlée) augmentent l'apparition des microcraquelures et impactent la forme des cristaux de cires. Les plaquettes deviennent des globules ou des clusters amorphes. Le phénomène s'exprime surtout lors du stockage sous atmosphère contrôlée.

Toutefois, le développement, la structure, la composition, l'épaisseur et la perméabilité de la cuticule restent assez variables. Si dans les quatre premières semaines qui suivent le bourgeonnement, le climat est doux et tempéré, la cuticule sera probablement plus fine et de composition chimique différente par rapport à des fruits qui se seront développés dans des conditions sèches et chaudes (Curry 2003 [94]).

L'observation au microscope d'une coupe transversale de la peau de deux variétés de pommes cultivées en Pologne (Szampion et Jonagold) immédiatement après la récolte puis après une période de stockage de 6 mois en atmosphère contrôlée montre que la cuticule s'épaissit au cours du stockage (Figure I-25).



Légende : Cu cuticule, ★ cellules de l'épiderme, H cellules de l'hypoderme, v microcraquelures de surface, → amyoplastes

Figure I-25 : Observation microscopique de l'épiderme de pommes Szampion (a et b) et Jonagold (c et d) respectivement avant et après stockage d'après Konarska 2012 [58]

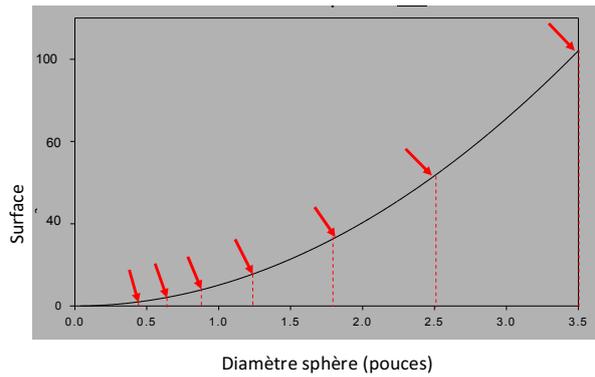
En général, la cuticule est significativement plus épaisse sur la face exposée aux UV (Konarska 2012 [58], Solovchenko et Merzlyak 2003 [96]). Six mois après stockage, l'épaisseur de la cuticule augmente pour devenir uniforme sur toute la surface du fruit. Le stockage induit des différences (quantité et structure) au niveau des cires épicuticulaires amorphes et cristallines. L'épaisseur de la couche de cire amorphe est similaire dans les deux variétés après stockage et a triplé par rapport à l'épaisseur initiale à la récolte. Si les cires amorphes sont le siège de la synthèse des cristaux de cires (Cf. § 2. 2. 3. c-) (Koch *et al.* 2005 [97]), la formation des cristaux de cire de Szampion et Jonagold résulte de conditions de synthèse similaires. Pourtant, la cire cristalline est plus abondante dans les pommes Jonagold aussi bien après récolte qu'après stockage. Il n'y a pas, chez Szampion, la formation de plus grandes quantités de cristaux. Pour Konarska, la génétique pourrait expliquer ces différences. Les variétés dont la peau est rugueuse sont recouvertes uniquement de cires amorphes et sujettes à de nombreuses microcraquelures survenues lors de la croissance des fruits. Il y a également une corrélation importante entre l'épaisseur de la cuticule et la prépondérance des craquelures de surface, augmentant ainsi les échanges avec l'extérieur. Les cires cristallines inhibent la transpiration tandis que la cire amorphe n'a aucun impact (Konarska 2012 [58]).

Belding *et al.* en 1998 [81] ont démontré que l'environnement dans lequel le fruit se développe a un plus grand impact sur la structure des cires que sur leur composition chimique. Les observations préliminaires à leur étude ont montré que tout contact physique sur la cuticule des pommes, y compris les gants des manipulateurs, altérerait la façon dont l'eau et les résidus chimiques étaient retenus sur la surface endommagée du fruit. Réciproquement, Curry en 2008 [61] a observé que la structure des cires épicuticulaires de la Royal Gala variait en fonction de la quantité de xénobiotiques appliqués à la surface du fruit. En effet, la sorption de DMSO dans des cuticules de tomates provoque une modification des spectres IRTF de la cuticule et du DMSO seuls : il semblerait que le DMSO forme une liaison hydrogène avec les groupes hydroxyles de la cuticule en lieu et place des liaisons hydrogène entre les groupes esters et hydroxyles de la cuticule. Une fois le DMSO désorbé, le spectre IRTF de la cuticule redevient identique à celui obtenu avant la sorption. De la même manière, il est possible d'observer, par IRTF, l'interaction forte qui relie un phytosanitaire tel que le fenitrothion ou le parathion aux cires épicuticulaires (Heredia-Guerrero *et al.* 2014 [98]).

2. 2. 5. Microcraquelures et lenticelles

a- Les microcraquelures de la surface

La cuticule est un tissu dynamique en constante croissance. De plus, elle est soumise à de fortes pressions provenant de la croissance des cellules de la chair du fruit, conduisant à l'apparition de craquelures plus ou moins importantes (Curry 2003 [94] et 2001 [95]). En effet, lorsque le fruit grossit, les tissus s'élargissent et la cuticule s'étire (Figure I-26). Les flèches rouges indiquent la fréquence à laquelle la surface est doublée.



Légende : → doublement de la surface

Figure I-26 : Graphique représentant la surface d'une sphère en fonction de son diamètre d'après Curry 2003 [94]

Les plaquettes des cires épicuticulaires s'éloignent et finissent par se rompre laissant apparaître des microcraquelures (Roy *et al.* 1999 [99]). La moindre déchirure à la surface de la cuticule conduit à la synthèse de cires. Ces cires agissent comme un scellement chimique prévenant ainsi la dessiccation du fruit. Ce phénomène que Curry nomme « déchirure et réparation » dépend de la synthèse des cires et en particulier des plaquettes de cires à la surface du fruit. Les cires de reconstruction à la surface de la cuticule suite à une déchirure sont perpendiculaires à la déchirure afin d'optimiser la protection du fruit vis-à-vis de la perte d'eau. Dans le cas de la variété Szampion, il n'y a pas de plaquettes verticales (Figure I-27) (Konarska 2012 [58]). La pomme Szampion est alors plus exposée à l'environnement extérieur (transpiration et attaque fongique).

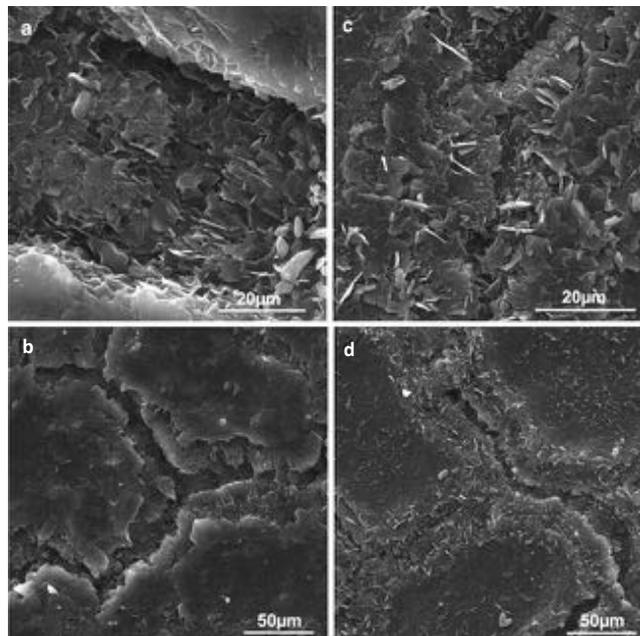


Figure I-27 : Microcraquelures à la surface de pommes Szampion (a et b) et Jonagold (c et d) après 6 mois de stockage en atmosphère contrôlée d'après Konarska 2012 [58]

Malgré les conditions nécessaires et suffisantes (expansion trop rapide des cellules, survenue d'un changement radical du microclimat), il arrive aussi que le mécanisme de réparation tarde exposant les cellules sous-jacentes qui se mettent alors à produire de la subérine (Curry 2003 [94]).

L'étude de Konarska en 2012 [58] démontre que les craquelures existent déjà sur la surface des Szampion au moment de la récolte alors qu'elles n'apparaissent qu'après stockage sur les Jonagold.

Pour d'autres auteurs cités dans l'étude de Roy *et al.* en 1999 [99], les craquelures apparaissent parfois tôt dans la phase de croissance, grandissent en largeur et en nombre lorsque le fruit grossit jusqu'à former un réseau interconnecté de craquelures plus larges à maturité. Roy *et al.* utilisent la microscopie à balayage électronique à basse température (cryo MEB) pour observer les surfaces de pommes Golden. Cette technique est réputée pour respecter la morphologie et l'ultrastructure des tissus des échantillons riches en eau : l'eau des cellules est retenue par cryogénéation dans de l'azote liquide tandis que l'eau de surface est sublimée ; l'échantillon ainsi fixé et recouvert de platine est transféré sous vide dans la chambre cryostatée de MEB. Dans cette étude, le réseau interconnecté des microcraquelures est bien visible deux semaines avant la récolte et aucune différence structurale sur la cuticule de pommes Golden n'est observée après la récolte. Après deux mois de stockage à froid, les microcraquelures concernent deux à trois couches successives de cires et après quatre mois, sept à huit couches. Pour Roy *et al.*, les microcraquelures existent avant la récolte du fruit et ne font que s'accroître par la suite (en termes de largeur et épaisseur), au cours du stockage. A ce stade de la vie des pommes, la croissance des cellules ne peut plus être responsable de l'expansion des microcraquelures. D'autres facteurs sont responsables comme l'humidité qui intervient pour une grande partie dans les chambres de stockage.

Dans l'étude de Konarska de 2012 [58], il est écrit que l'origine des microcraquelures tient à la présence de grandes quantités d'eau causant la dégradation des composés des parois cellulaires de la peau des fruits en développement sur l'arbre. Knoche & Grimm ont mis en évidence l'impact de l'eau ou d'une forte concentration de vapeur d'eau sur la survenue des microcraquelures à la surface des pommes Golden Delicious, Braeburn, Jonagold et Topaz ; les pommes Idared sont moins sensibles à l'humidité (Knoche et Grimm 2008 [100]). Certains cultivars de pommes Fuji sont génétiquement prédisposés aux microcraquelures (Cury 2003 [94]).

b- Les lenticelles des pommes

Chez les végétaux, dans les feuilles notamment, les échanges gazeux sont facilités par la présence des stomates (Figure I-28) :

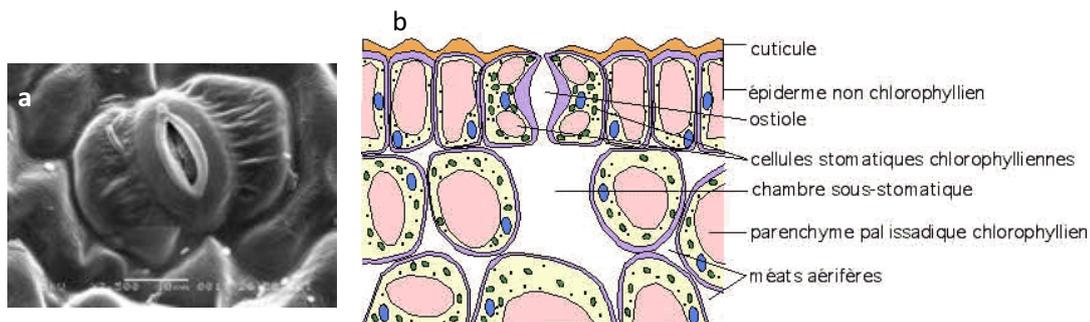


Figure I-28 : Observation d'un stomate par MEB (a) et sa représentation schématique en coupe (b) d'après Prat 2005 [101]

Le stomate est une structure intelligente capable d'ajuster l'ouverture de son orifice (ostiole, Figure I-28) afin de gérer la plupart des échanges gazeux nécessaires à la transpiration, la respiration et à la photosynthèse (Veraverbeke *et al.* 2003 [63]). Il y a peu de réminiscence des stomates dans la plupart des fruits et notamment sur la peau des pommes à maturité. En revanche, il existe sur la surface de la pomme des ouvertures non contrôlées appelées lenticelles, plus grosses que les stomates (plusieurs centaines de microns) (Figure I-29) dont la plupart se développe à partir des stomates du jeune fruit (Curry 2003 [94]).

Contrairement aux craquelures, le nombre de lenticelles est fixé au cours du développement initial du fruit et n'augmente pas par la suite. Au contraire, leur densité diminue au cours de la croissance du fruit (Veraverbeke *et al.* 2003 [63]).

Les lenticelles ont des formes diverses (ovales, en forme d'étoile, de lentille ou de stomate) (Figure I-29) et présentent différents stades de développement (Konarska 2012 [58]) :

- lenticelles fermées caractérisées par des cellules hypodermiques contenant de la subérine et de la cutine, et/ou des lenticelles contenant du phellogène ou remplies de cutine,
- lenticelles ouvertes dont les parois des cellules sont composées de cellulose.

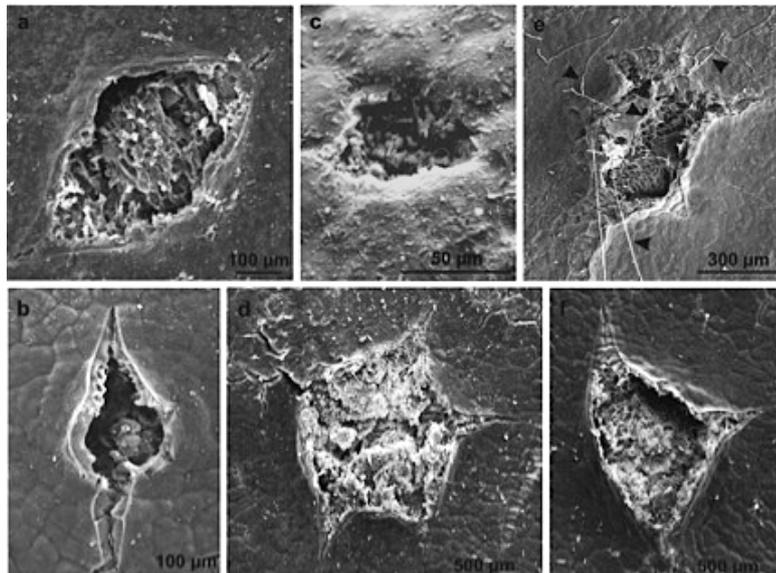


Figure I-29 : Différentes formes de lenticelles à divers stades de développement sur les épidermes de pommes Szampion (a, e, f) et Jonagold (b, c, d) observées par MEB d'après Konarska 2012 [58]
Légende : flèche = présence d'un réseau mycélien (e)

Les lenticelles sont également soumises aux variations de pression liées à l'expansion des cellules sous-jacentes du fruit en cours de maturation (Figure I-29, d). Dans des conditions climatiques normales et lors d'un développement normal des fruits, peu de lenticelles se déchirent. En 2001, dans l'état de Washington, les conditions climatiques particulièrement chaudes et sèches au moment de la croissance – trop rapide – des pommes Gala et Fuji ont eu un grand impact sur la rupture des lenticelles. La plupart des pommes (Granny Smith, Delicious, Golden Delicious, Pink Lady®, Gala, Fuji...) possèdent des lenticelles déchirées mais les variétés Royal Gala et Fuji BC2 sont de loin les plus exposées à ce phénomène qui tient plus des conditions de culture que de prédispositions génétiques (Curry 2003 [94]).

2. 3. Fractionnement chimique de la cuticule

2. 3. 1. Extraction sélective des cires épicuticulaires

La microscopie électronique a permis de mettre en évidence l'existence d'une couche semi-continue ou continue de cire amorphe et de cristaux de cires de différentes formes à la surface de tous les végétaux supérieurs, notamment chez *Malus sp.* (Buschhaus et Jetter 2011 [71], Barthlott *et al.* 1998 [88]). La surface microscopique de ces cires peut être lisse ou bien rugueuse, selon la forme des cristaux épicuticulaires : plaquettes, rubans, tubules... (Gniwotta *et al.* 2005 [102]). Il existe de

nombreuses formes de cristaux (Barthlott *et al.* 1998 [88]). Elles sont corrélées à diverses molécules majoritaires. Les compositions chimiques des cires intra et épicuticulaires et de leurs cristaux ne sont pas identiques (Cf. § 2. 2. 3. c-) (Jetter *et al.* 2000 [85]).

De nombreux travaux réalisés entre 1964 et 1995 exploitent le « lavage chimique » comme technique d'extraction sélective (Jetter *et al.* 2000 [85]). Les cires cuticulaires sont extraites par immersion dans des solvants organiques et même par extraction au Soxhlet. En jouant sur la nature des solvants, la température et/ou la durée d'extraction, distinctes couches de cires pourraient ainsi être atteintes, laissant entendre que des conditions d'extraction douces peuvent libérer les composés épicuticulaires tandis qu'une extraction plus approfondie des membranes cuticulaires isolées permet d'atteindre les composés intracuticulaires (Buscchaus et Jetter 2011 [71], Jetter *et al.* 2000 [85]). Toutefois, la séparation chimique des cires épicuticulaires des autres cires n'est pas totalement sélective. Ce sont les différents composés des cires (alcanes, alcools, acides, esters) qui se trouvent être discriminés de cette façon, et non pas les composés des différentes cires. Dans l'étude de Fernandes *et al.* (Cf. § 2. 2. 3. b-), l'acide ursolique, pourtant marqueur des cires intracuticulaires (Cf. § 2. 2. 3. e-), est caractérisé à hauteur de 35% dans les cires épicuticulaires de pommes Bramley et à 58% dans les cires intracuticulaires (Fernandes *et al.* 1964 [80]). Ces résultats illustrent parfaitement le manque de sélectivité de l'extraction séquencée par solvants.

Néanmoins, il est possible de séparer sélectivement les cires intra- et épicuticulaires par un procédé mécanique appelé « *stripping* » afin de les analyser séparément. Les cires épicuticulaires sont arrachées par un film plastique adhésif et les cires intracuticulaires peuvent ensuite être extraites par solvants. Haas et Rentschler publient en 1984 le premier protocole d'extraction mécanique des cires épicuticulaires à partir d'un film de polymère. Il s'agit initialement d'une solution de nitrocellulose à 6% (M/V) dans l'acétate d'amyle mais il existe aussi des solutions commerciales dans un mélange éther/éthanol (3 :1, V/V). La sélectivité reste limitée car les solvants organiques de la solution peuvent pénétrer profondément dans la cuticule entraînant ainsi des mélanges entre cires intra et épicuticulaires. Garrec *et al.* en 1995 [67] optimisent cette méthode de *stripping* pour récupérer dans un premier temps les cires épicuticulaires sur des feuilles d'Eucalyptus à partir d'une solution de nitrate de cellulose à 6% (M/V) dans l'acétone. Les cires intracuticulaires sont ensuite solubilisées dans le chloroforme.

Une autre méthode mécanique, beaucoup plus sélective pour l'analyse des cristaux épicuticulaires, consiste à frotter à plusieurs reprises la surface avec un tissu de verre sec (Buscchaus et Jetter 2011 [71]).

En 1996, Jeffree propose une méthode fondée sur l'utilisation de glycérol congelé afin de transférer les cires superficielles sur des substrats artificiels pour les observer au microscope électronique. Les conditions expérimentales ne sont alors pas publiées. Il faut attendre les travaux de Ensikat *et al.* en 2000 [103] : les cristaux de cires épicuticulaires – en particulier les nanotubes – peuvent être extraits par les gouttelettes de solvants polaires à -100°C (glycérol, triéthylène glycol TEG) dont la faible mouillabilité sur des surfaces recouvertes de cires peut être modifiée au cas par cas par ajout d'eau ou de t-butanol. La technique se montre assez efficace pour un très grand nombre d'espèces (feuilles, fruits, pousses, petits et grands échantillons, sur du matériel frais ou séché). Les solvants polaires comme le glycérol et le TEG avec une mouillabilité faible à moyenne sont idéaux pour la récupération des cires de par leur inertie, leur hydrosolubilité, leur inaptitude à solubiliser les cires et à cristalliser dans l'azote liquide. De la mouillabilité du solvant dépend la sélectivité de l'adhésion des

cires. En effet, si la mouillabilité est trop élevée, le solvant diffuse à travers les différentes couches de cires et il est impossible de séparer l'échantillon de la goutte de solvant congelé. Des cristaux de cires épicuticulaires peuvent sélectivement être isolés en sélectionnant un solvant de plus faible mouillabilité tandis que l'intégralité de la couche épicuticulaire peut être récupérée avec un solvant de plus grande mouillabilité (Figure I-30).

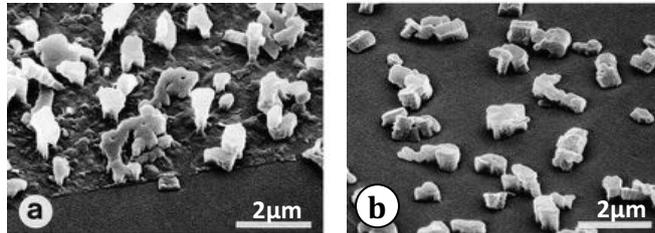


Figure I-30 : Micrographes (MEB) de cires épicuticulaires de *Gypsophi acutifo* : (a) cristaux et film sous-jacent de cires épicuticulaires isolés par TEG, (b) cristaux isolés par du glycérol d'après Ensikat et al. 2000 [103]

La mouillabilité des solvants peut donc être optimisée selon la sélectivité à atteindre. Pour des surfaces hydrophobes, les solvants suivants sont classés par ordre croissant de mouillabilité : Glycérol/eau (60/40) < glycérol (100) < TEG (100) < TEG/t-butanol (80/20).

Dans la plupart des cas, le glycérol permet d'isoler sélectivement les cristaux tandis que le TEG récupère l'intégralité de la couche épicuticulaire. Pour les surfaces adaxiales des feuilles de *Rosa sp.*, *Hedera helix*, *A. gigantea* et pour la pomme *Malus domestica*, dont les surfaces sont plutôt lisses et dont les cires sont caractérisées par un film plutôt épais ou des cristaux, la séparation par le TEG est impossible. Quant au glycérol, il récupère l'intégralité de la couche épicuticulaire. La technique est particulièrement efficace pour des surfaces plutôt lisses. L'isolement quantitatif des couches de cire dépend de la morphologie de surface et n'est donc pas toujours possible (cristaux de cire englués dans un film sous-jacent épais chez *Ginkgo Biloba* ou *Picea abies*). Toutefois, elle préserve l'intégrité des cristaux. Elle peut être même utilisée pour récupérer certains cristaux fragiles comme les tubules de *T. flavum*, en refroidissant l'échantillon à 0°. Jetter et al. en 2000 [85] proposent également un procédé mécanique d'extraction d'un film lisse, sans cristaux, des cires épicuticulaires des feuilles de *Prunus laurocerasus*, basé sur la cryo adhésion de glycérol ou d'eau : une microgoutte de glycérol est déposée sur une spatule métallique, un petit disque de feuille est découpé pour y être déposé, puis le tout est immergé dans l'azote liquide. La feuille est décollée immédiatement après et le glycérol est extrait par du chloroforme. L'extraction mécanique est répétée jusqu'à récupération totale des cires épicuticulaires (Figure I-31, b). La matrice de cutine est alors nettement visible, à gauche des pointillés blancs (Figure I-31, a).

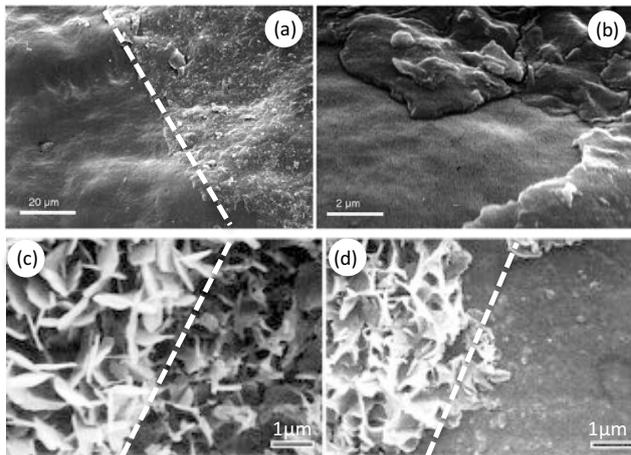


Figure I-31 : Micrographes (MEB) (a) de la surface adaxiale de feuilles de *Prunus laurocerasus* après cryo-extractions (glycérol), (b) le film de cires épicuticulaires obtenu d'après Jetter *et al.* 2000 [85], (c) de la surface adhésive de la plante carnivore *Nepenthes alata* après une cryo-adhésion, (d) après 5 cryo-adhésions d'après Riedel *et al.* 2003 [86]

Le glycérol et l'eau sont de bons cryo-adhésifs. Cependant, la polarité du solvant a une incidence sur l'efficacité du traitement. A terme, après n extractions jusqu'à épuisement des cires épicuticulaires, le rendement total est indépendant de la nature chimique du solvant utilisé comme cryo-adhésif.

La méthode développée par Jetter *et al.* en 2000 [85] devient la référence en terme de sélectivité entre les deux couches de cires : c'est la première fois que des travaux justifient les termes de cires intra- et épicuticulaires en faisant référence à leur localisation par rapport à la matrice de cutine : dans ou sur la cutine. Cependant, cette méthode ne peut pas être utilisée *in vivo*... En 2001, Jetter et Schäffer [84] démontrent que des solutions aqueuses à 90 % (M/M) de gomme arabique (*Acacia senegal* ou *Acacia seyal*) peuvent être appliquées au pinceau sur la surface des feuilles de *P. laurocerasus*, qui après séchage forment un film sur lequel les cires épicuticulaires adhèrent aussi bien que sur les cryo-adhésifs. Après une à deux heures de séchage, le film est cassé en morceaux et les cires épicuticulaires sont extraites par un mélange 50 :50 (V/V) de chloroforme et d'eau. Même si la méthode a ses limites (protrusions cellulaires), elle est non destructive et peut être utilisée *in vivo*.

Riedel *et al.* en 2003 [86] mettent au point une version modifiée des méthodes de Jetter *et al.* [85] : ils utilisent l'eau ou la gomme arabique comme cryo-adhésif pour isoler des cristaux en forme de plaquettes caractéristiques des cires épicuticulaires des plantes carnivores du genre *Nepenthes*. Un cylindre métallique est appliqué à la surface de la feuille et rempli d'eau. L'ensemble est congelé dans de l'azote liquide. La feuille est décollée du bloc de glace sur lequel la cire a adhéré. Après avoir réchauffé les parois du cylindre, le bloc de glace est libéré et les cires sont extraites dans un mélange 50 :50 (V/V) de chloroforme et d'eau à 40°C. L'analyse de la surface par MEB fait apparaître à droite des pointillés blancs la zone des cristaux traités par une cryo-adhésion (Figure I-31, c). L'extraction des cires de l'échantillon de feuille peut être répétée cinq fois sans endommager les tissus végétaux. Après 5 cryo-extractions, la matrice de cutine apparaît distinctement à droite des pointillés blancs (Figure I-31, d).

Une seconde option consiste à imprégner un disque en treillis métallique d'une solution aqueuse de gomme arabique et d'appliquer ce disque à la surface de la feuille. Après séchage (2 heures à 25°C), le disque est décollé de la feuille emportant avec lui les cires. Les cires sont extraites comme dans le cas précédent. Il est possible d'extraire les cires épicuticulaires de cette façon quatre fois

consécutives avant d'endommager la cuticule et les cellules sous-jacentes, mais l'extraction n'est toutefois pas complète.

Les cristaux sous forme de plaquettes des cires épicuticulaires de *N. alata* sont extraits en toute intégrité quelle que soit la méthode considérée. Toutefois, l'extraction sélective par l'eau glacée est plus efficace que celle par la gomme arabique en terme de rendement et d'extraction. Néanmoins, le rendement total en cires obtenu après l'extraction finale au chloroforme des cires intracuticulaires est similaire quelle que soit la méthode de stripping utilisée pour extraire sélectivement les cires épicuticulaires.

Toutes ces méthodes sélectives d'extraction par cryo-adhésion ont prouvé leur efficacité (sélectivité et exhaustivité) sur des films lisses de cires épicuticulaires mais également sur des cristaux en forme de plaquettes. Afin d'isoler sélectivement (sans la couche basale de cires) les cristaux très fragiles sous forme de nanotubes, que l'on trouve notamment sur les aiguilles de *Picea pungens* (Engelmann), Coward en 2007 [104] prépare un mélange de 80% de solution aqueuse saturée à 2 g/mL de sucrose et 20% d'éthanol, suffisant à la mouillabilité du matériel végétal. Une goutte du mélange est déposée sur une lame de microscope et les aiguilles sont placées dessus une après l'autre jusqu'à ce que la goutte soit recouverte d'aiguilles (10 en moyenne au total). Les lames sèchent pendant 5 jours à l'air libre puis deux jours supplémentaires dans un dessiccateur. Les aiguilles sont alors délicatement ôtées de l'adhésif. Les cires sont alors libérées par simple dissolution du sucrose dans l'eau. Les lames sèches sont immergées dans un bain d'eau. Au fur et à mesure de la dissolution du sucrose, les nanotubes de cires sont libérés et récupérés sur un film de Mylar tendu au-dessus de la lame dans l'eau. L'eau est ensuite délicatement siphonnée au maximum et le reste est séché. La méthode est en plus non destructive et peut être utilisée in vivo, mais son efficacité est limitée (récupération non exhaustive, surfaces avec peu de cristaux, matériel végétal vieux ou séché. Les nanotubes présents dans les cires épicuticulaires des aiguilles de *Taxus baccata* ont été sélectivement isolés par trois extractions successives par une solution aqueuse de gomme arabique à 1 g/mL appliquée au pinceau (Wen *et al.* 2006 [90]). Après 30 minutes de séchage, l'adhésif est récupéré et extrait par du chloroforme à température ambiante.

Pour les pommes notamment, la facilité d'extraction des cires épicuticulaires varie selon les variétés (Hall 1966 [105]). Les cristaux, majoritairement composés d'alcools secondaires, alcanes, acides et esters, se présentent sous différentes formes : plaquettes, tubules (Nonacosanol) et films dont les températures de fusion sont de l'ordre de 60°C (Ensikat *et al.* 2006 [106]).

Après extraction des cires épicuticulaires, les cires intracuticulaires peuvent alors être extraites par solvant (immersions dans du chloroforme à 40°C (Riedel *et al.* 2003 [86] et 2007 [87]). Les deux catégories de cires peuvent ensuite être analysées, avec une très grande sélectivité.

2. 3. 2. Fractionnement pour la caractérisation chimique de l'épiderme et de la cuticule de pommes

A partir des nombreux éléments apportés par la littérature, un schéma de synthèse de fractionnement est proposé dans la Figure I-32 afin d'évaluer la composition chimique de l'épiderme et en particulier de la cuticule de la pomme.

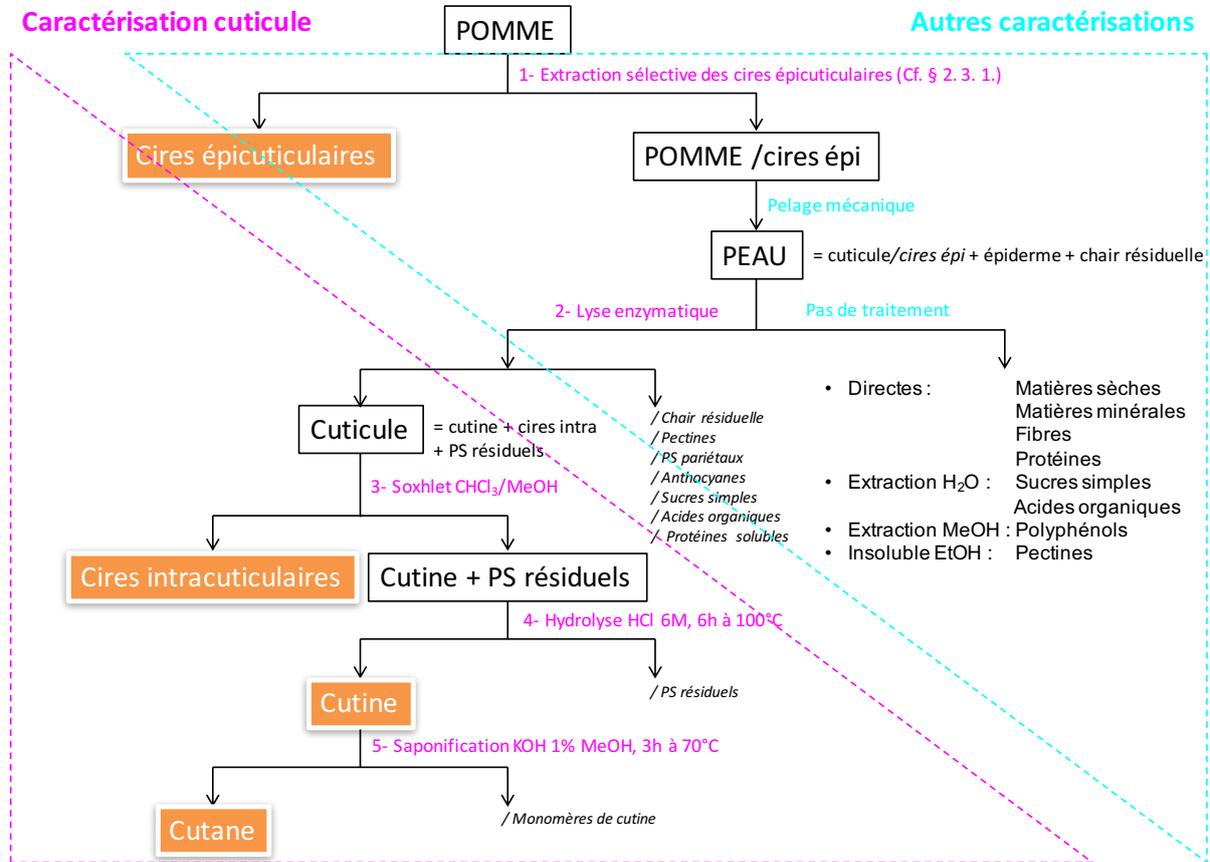


Figure I-32 : Schéma de synthèse pour le fractionnement et la caractérisation chimique de l'épiderme de la pomme (en bleu) et en particulier de la cuticule (en rose)

Sur la base de la différenciation des lipides solubles de la cuticule, le schéma propose la possibilité d'une extraction sélective des cires épicuticulaires (Figure I-32, 1). Les molécules très lipophiles des cires sont en général facilement solubles dans les solvants organiques classiques à température ambiante : chloroforme, chloroforme/méthanol, chloroforme/éther, éther, benzène, hexane, éther de pétrole... (Riederer et Schneider 1989 [107]). Les travaux de Jetter *et al.* en 2000 [85], les molécules de solvant pénètrent la cuticule et solubilisent toutes les cires intra- et épicuticulaires indistinctement. Sans sélectivité, ces extractions permettent d'évaluer la quantité totale de cires et leur composition globale. Il est possible d'éliminer la phase d'extraction sélective et de procéder directement à l'extraction des cires totales par Soxhlet à partir de la cuticule lysée.

Dans le cas des feuilles, isoler la cuticule consiste à dissoudre les pectines qui cimentent la couche cuticulaire avec la membrane épidermique externe (Bonnier 1963 [78]). Concernant les cuticules de pommes, le développement de la cutine autour de la membrane épidermique externe pénètre l'épaisseur de la membrane et descend entre les cellules de l'épiderme comme l'illustrent bien les images MEB des coupes de peaux de pommes de la Figure I-33. Etant donné que cette membrane est très mince, il est alors difficile de dissocier totalement la cuticule de l'épiderme des pommes. En

revanche, la couche de pectines étant plus importante entre l'épiderme et l'hypoderme, elle se dissoudra beaucoup plus facilement.

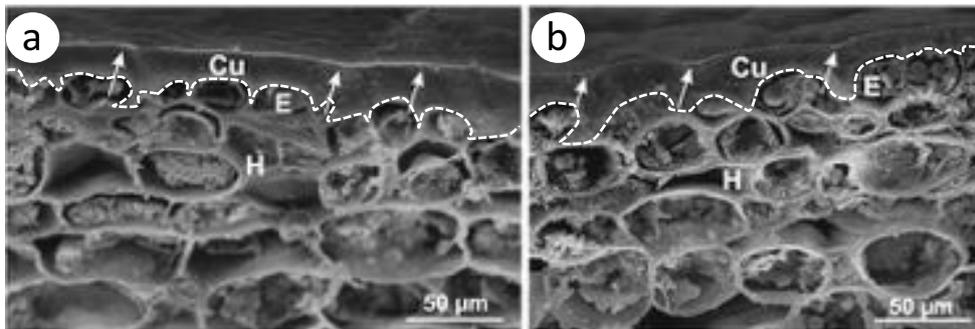


Figure I-33 : Micrographes de coupes transversales d'épidermes de pommes Szampion (a) et Jonagold (b) par MEB TESCAN/VEGA LMU à 30 kV d'après Konarska 2012 [58]

Légende : Cu = cuticule
E = épiderme
H = hypoderme

D'anciennes méthodes consistaient à plonger les peaux dans de l'acide sulfurique ou chlorhydrique dilué. Depuis, la méthode mise en œuvre pour isoler la cuticule de la membrane épidermique de diverses espèces de végétaux est une méthode d'incubation (Figure I-32, 2) de durée et température variables dans deux solutions distinctes (Tableau I-18).

Espèces végétales	Méthode	Références
Pommes, tomates, pépins de tomates, grains de poivre et de poivre vert, feuilles d'Agave americana, olives, aiguilles de pin	Solution d'oxalate d'ammonium et d'acide oxalique, pH = 4	Chen <i>et al.</i> 2008 [73], Johnson <i>et al.</i> 2007 [74], Bonnier 1963 [78], Morozova et Sal'kova 1966 [79], Richmond et Martin 1959 [108], Luque et Heredia 1994 [109], Deshmukh <i>et al.</i> 2003 [110], Chen <i>et al.</i> 2005 [111], Shechter <i>et al.</i> 2006 [112], Li <i>et al.</i> 2009 [113], Li <i>et al.</i> 2010 [114]
Pommes, kakis, tomates, piment, grains de poivre vert, feuilles (figes, oranges amères, poires, lierre commun, pommes, peuplier, peuplier gris, jasmin de Madagascar, pomelos, houx, thé du Paraguay, poires chinoises, laurier-cerise...)	Solution enzymatique à base de pectinase et cellulase, préparée dans un tampon d'acétate ou de citrate de sodium, pH = 4	Tsubaki <i>et al.</i> [91], Schönherr et Riederer 1986 [110], Bauer et Schönherr 1992 [116], Baur <i>et al.</i> [117], Buchholz <i>et al.</i> 1998 [118], Buchholz et Schönherr 2000 [119], Schreiber <i>et al.</i> 2001 [120], Stark <i>et al.</i> 2008 [121], Chatterjee <i>et al.</i> 2012 [122], Khanal <i>et al.</i> 2014 [123]

Tableau I-18 : Méthodes d'isolement de la cuticule

Bonnier en 1963 [78] privilégie une solution d'oxalate d'ammonium et d'acide oxalique à pH 4,2. Après 16 heures d'incubation à 50°C, l'épiderme se détache facilement du parenchyme. Après 40 heures d'incubation, la cuticule se sépare de l'épiderme. Morozova et Sal'kova en 1966 [79] considèrent qu'après 48 heures d'incubation à 37°C il ne reste sur la cuticule qu'une fine couche de cellules épidermiques.

Après isolement des cuticules et broyage, les cires totales peuvent être extraites par Soxhlet (Figure I-32, 3) :

- soit par extractions successives à l'éther de pétrole puis à l'éther sulfurique suivies de recristallisation dans l'acétone (Bonnier 1963 [78]),
- soit par extractions successives par des solvants de polarité décroissante méthanol > chloroforme > hexane (Chatterjee *et al.* 2012 [122]),
- soit par une extraction par un mélange solvant chloroforme/méthanol (1 :1) (Li *et al.* 2010 [114], Shechter *et al.* 2006 [112], Chen *et al.* 2008 [73]).

La cuticule ainsi décirée est hydrolysée à 90-100°C sous reflux dans une solution d'acide chlorhydrique 6 mol/L pendant 6 heures (Figure I-32, 4). La réaction hydrolyse les polysaccharides résiduels et isole ainsi la cutine sous forme de résidu solide. Le résidu de cutine est récupéré par filtration et rincé à l'eau jusqu'à pH neutre. Il est ensuite chauffé à 70°C sous reflux dans une solution de potasse à 1 % dans le méthanol pendant 3 heures. La saponification libère les monomères de cutine et l'ultime résidu solide obtenu correspond au cutane (Figure I-32, 5). Le résidu de cutane est récupéré par filtration et rincé au méthanol et à l'eau jusqu'à pH neutre (Chen *et al.* 2008 [73], Li *et al.* 2010 [114]).

2. 4. Caractérisation spectroscopiques des lipides cuticulaires des pommes

2. 4. 1. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

La caractérisation des cuticules par spectroscopies IR et Raman (Figure I-34) a permis de mettre en évidence différents groupes fonctionnels (Chen *et al.* 2008 [73], Johnson *et al.* 2007 [74], Heredia-Guerrero *et al.* 2014 [98]) :

- une bande de vibration de valence O-H vers 3400 cm^{-1} , liée à la présence de polysaccharides et de fonctions hydroxyles non estérifiées de la cutine,
- deux bandes fortes vers 2920 et 2850 cm^{-1} de vibration de valence CH_2 asymétrique et symétrique respectivement, associées aux bandes de vibration de déformation CH_2 des chaînes aliphatiques des composés de la cutine, des cires et du cutane,
- une forte bande vers 1730-1740 cm^{-1} de vibration de valence C=O des fonctions esters de la cutine, associée aux deux bandes de vibration de valence C-O-C vers 1167 et 1104 cm^{-1} .

D'autres bandes sont également visibles :

- trois épaulements sur la bande de vibration de valence C=O ester vers 1715, 1705 et 1685 cm^{-1} corrélables à des groupements esters et acides soumis à des liaisons hydrogène (composés triterpénoïdes des cires).
- des bandes mineures dans la région 1650-1500 cm^{-1} corrélables à des aromatiques et des doubles liaisons C=C provenant des polyphénols ou du cutane.

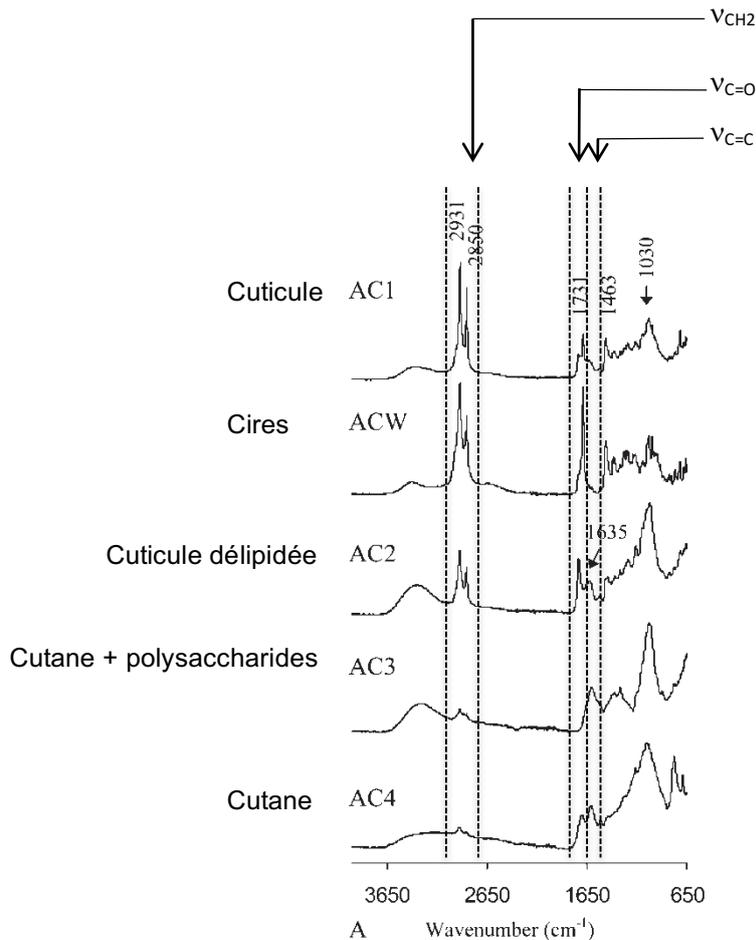


Figure I-34 : Spectres IRTF de différentes fractions d'épiderme de pommes d'après Johnson et al. 2007 [74]

En établissant le ratio de la hauteur des deux bandes ν_{CH_2} et $\nu_{\text{C=O}}$ proche de 1730 cm^{-1} , il est possible d'évaluer le degré de polymérisation de la cutine. Plus le ratio est faible, plus le degré de polymérisation est élevé.

2. 4. 2. Résonance magnétique nucléaire du ^{13}C solide

A partir des spectres de RMN du ^{13}C solide obtenus par polarisation croisée à l'angle magique de rotation (RMN CP-MAS) (Figure I-35), quatre régions peuvent être définies (Shechter et al. 2006 [112]) :

- de 0 à 50 ppm, les carbones des paraffines,
- de 50 à 100 ppm, les carbones des alcools, amines, carbohydrates, éthers et carbones méthoxylés,
- de 100 à 163 ppm, les carbones aromatiques et phénoliques,
- de 163 à 220 ppm, les carbones des fonctions carboxyliques, carbonyles et amides.

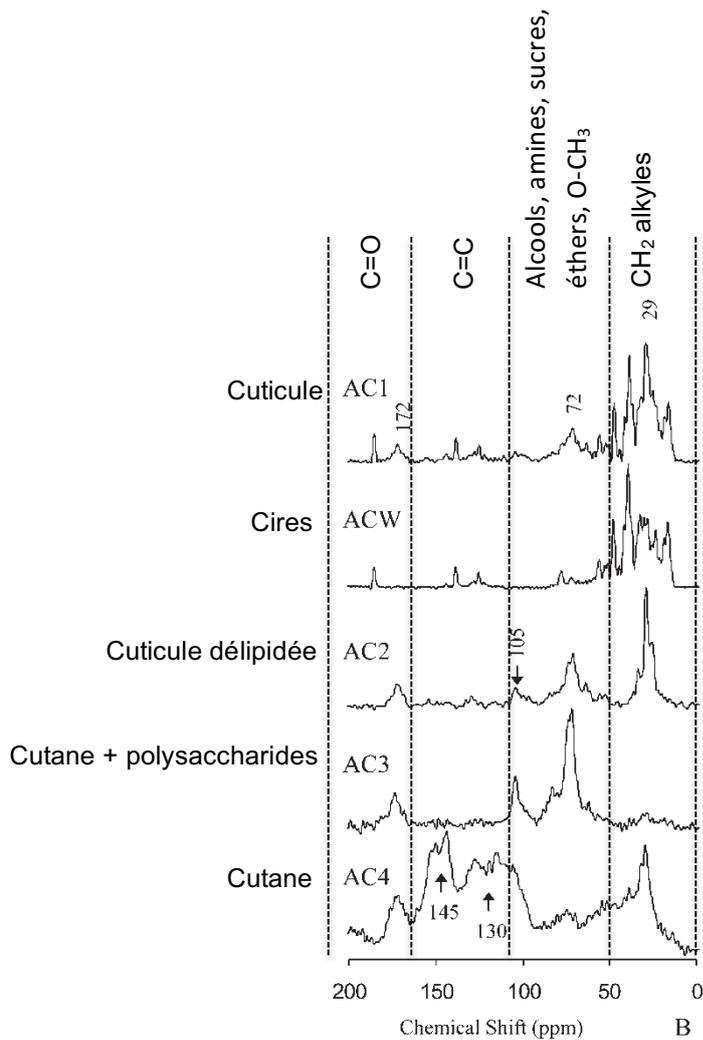


Figure I-35 : Spectres RMN CP-MAS du ^{13}C solide de différentes fractions de l'épiderme de pomme d'après Johnson et al. 2007 [74]

Les groupes fonctionnels principaux de la cuticule sont identifiés :

- les signaux CH_2 vers 29 ppm des chaînes alkyles en C16 et C18,
- les signaux des polysaccharides pariétaux de 60 à 105 ppm,
- les signaux relatifs au groupement $\text{C}=\text{O}$ à 172 ppm des fonctions esters du polymère.

Les groupes fonctionnels principaux des cires cuticulaires sont également identifiés :

- les signaux CH_2 vers 32 ppm des chaînes alkyles des lipides solubles (C16-C40),
- les signaux $\text{C}=\text{C}$ vers 140 ppm des cycles aromatiques et phénoliques,
- les signaux $\text{C}=\text{O}$ des fonctions esters et acides (triterpéniques) des lipides solubles vers 180 ppm.

2. 5. Les deux voies de diffusion dans la cuticule

2. 5. 1. Rôle des lipides cuticulaires

Chacune des familles de composés chimiques constituant les lipides cuticulaires a une fonction précise dans la protection du végétal, à commencer par la prévention des pertes hydriques, de loin la plus importante (Buscchaus et Jetter 2011 [71], Riederer et Schreiber 1995 [126]). Les multiples travaux de Schönherr ont démontré le rôle essentiel des lipides cuticulaires solubles dans la perméabilité de la cuticule. Dans la tomate, la cutine devient 20 fois plus perméable que la cuticule et dans l'oignon rouge 1542 fois plus (Maguire *et al.* 1999 [127]). La perte en eau des pommes Golden Delicious est plus rapide que celle d'autres cultivars en cours de stockage. Leurs cires comportent de 54 à 70 % en masse totale extraite de triterpènes, les forts taux en triterpène étant généralement négativement corrélés avec la rétention de l'eau (Szakiel *et al.* 2012 [62]). Les composés aliphatiques à très longue chaîne équitablement partagés entre les cires intra- et épicuticulaires seraient responsables de l'effet barrière (Vogg *et al.* 2004 [128]).

La mouillabilité de la surface des plantes et des fruits est liée à la couche de cires et à leur distribution et par conséquent à la morphologie des cristaux (Hall 1966 [105]). Les mesures d'angle de goutte d'eau réalisées par Hall sur la surface de différentes variétés de pommes (Sturmer, Granny Smith, Golden Delicious et Red Dougherty) montrent que les gouttelettes adhèrent sur l'épiderme avec des angles de goutte variant de 80 à 95°. La Golden Delicious possède la surface la moins mouillable avec un angle de contact moyen de 94,5°. Elle est caractérisée par des bandes de cires de forme irrégulière (Figure I-36, 1).

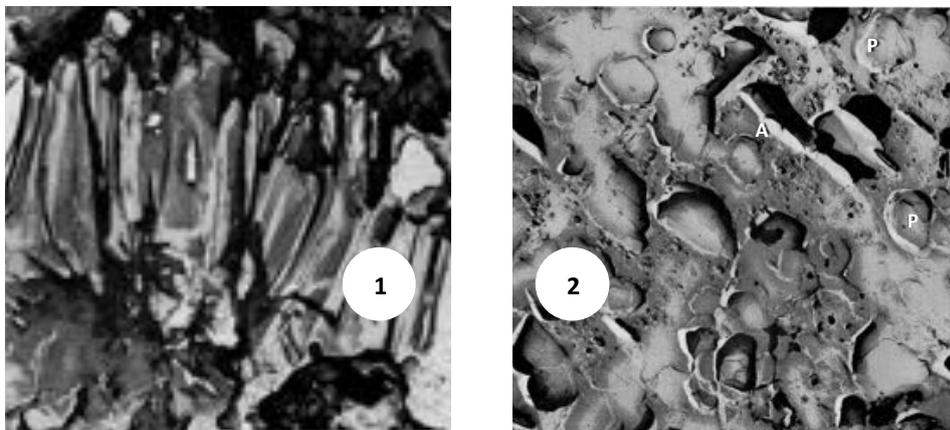


Figure I-36 : Micrographes de la surface de pommes Golden Delicious x2500 (1) et de la surface après abrasion de Granny Smith x6500 (2) d'après Hall 1966 [105]

Légende : P = plaquettes

A = cire

Les surfaces recouvertes de cires sous forme de bâtonnets ou de plaquettes présentent une mouillabilité toujours plus importante car les cires sont facilement cassées et enlevées par abrasion. Les cires restantes se redistribuent à la surface provoquant ainsi l'augmentation de la mouillabilité. Les cristaux sous forme de tubes et de plaquettes entraînent une faible mouillabilité. Les cires de la Granny Smith se présentent comme des couches cristallines qui s'étendent à plat à la surface de la cuticule. Lorsque la surface est frottée, les couches glissent les unes sur les autres très aisément (Figure I-36, 2). La surface de la Granny Smith possède une mouillabilité importante (80-88°).

La nature des composés constituant les cires impacte la mouillabilité de la surface (Tableau I-19). Cette dernière est évaluée à partir de la mesure de l'angle de goutte à la surface des composés déposés sur une lame de verre lisse soit par fusion ou par évaporation du solvant de dissolution (Holloway 1969 [129]).

Nature composé	Nombre C	Angle de goutte moyen (DS)
Alcanes	C18, C19, C20, C24, C28, C32, C36	105°55'-108°51' (35')
Esters	C24, C26, C28, C30, C32, C34, C40	104°11'-105°50' (45')
Cétones	C23,	106°18' (24')
	C29,	104°18' (24')
	C35	106°18' (24')
Alcools secondaires	C23,	104°18' (13')
	C29,	103°20' (32')
	C35	104°02' (20')
Alcools primaires	C16, C18, C20, C22, C28	94°13'-95°30' (61')
Acides gras	C16, C18, C19, C20, C22, C23, C24, C28	101°13'-102°15' (43')
α - ω -diols	C22, C24, C26	70°21'-71°15' (82')
Acides hydroxylés	Hydroxy-12-C18 :0	95°44' (30')
	Hydroxy-22-C22 :0	90°17' (37')
Stérols	Stigmasterol	92°02' (30')
	β -sitosterol	95°15' (20')
	cholesterol	82°33' (35')
	Cholesteryl hexadecanoate	104°15' (31')
	Cholesteryl octadecanoate	103°09' (25')
Triterpénoïdes	Lupéol	95°43' (40')
	Lupeyl acetate	95°34' (68')
	β -amyrenyl acetate	91°01' (41')
	Acide ursolique	89°53' (63')

Légende : DS = déviation standard

Tableau I-19 : Relation entre angle de goutte (eau) et nature des composés chimiques des cires cuticulaires d'après Holloway 1969 [129]

Plus les cires sont riches en alcanes, esters, cétones et alcools secondaires à longue chaîne, plus la surface est hydrophobe ($\Theta > 100^\circ$). Les cires riches en alcools primaires seront un peu moins hydrophobes ($\Theta \sim 94-95^\circ$). Enfin, l'acide ursolique est beaucoup moins hydrophobe que l'ensemble des autres composés ($\Theta = 89^\circ$), à l'exception des diols, les moins hydrophobes de tous ($\Theta = 70^\circ$). La mouillabilité augmente avec la polarité des composés, d'autant plus si les groupements polaires sont terminaux.

Une fois les lipides cuticulaires solubles extraits, la perméabilité de la cutine est liée au pH, aux contre-ions en solution et à l'activité de l'eau. La transpiration *via* la cuticule et la perméabilité de la celle-ci vis-à-vis des molécules lipophiles (pesticides, herbicides et autres xénobiotiques) sont très fortement corrélées : l'eau pénètre la cuticule de la même façon que les molécules lipophiles, c'est-à-dire en utilisant la voie de diffusion apolaire (Schreiber 1995 [130]).

2. 5. 2. Distinction entre cires amorphes et cires cristallines : définition de la voie de diffusion apolaire

Les lipides cuticulaires solubles, c'est-à-dire les cires, se présentent soit sous forme amorphe, soit sous forme cristalline (Figure I-37) (Riederer et Schreiber 1995 [126], Reynhardt et Riederer 1994 [131], Riederer et Schneider 1990 [132]).

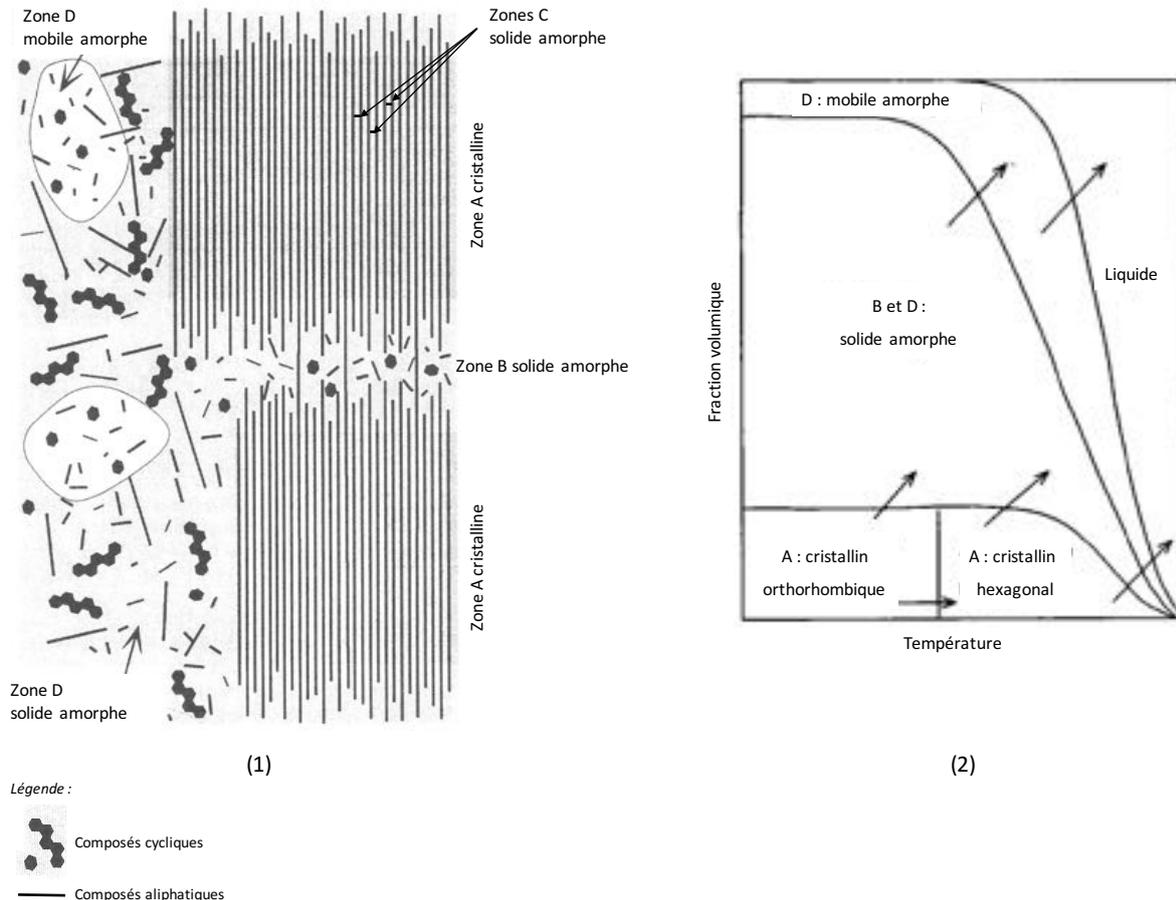


Figure I-37 : Représentation schématisée de la structure moléculaire des cires cuticulaires (1) d'après Riederer et Schreiber 1995 [126] et diagramme de phase des cires en fonction de la température (2) d'après Reynhardt et Riederer 1994 [131]

La zone A est caractérisée par des couches de cires cristallines (Figure I-37, 1), de structure orthorhombique à une température inférieure à la température de fusion des cires et hexagonale lorsque la température de fusion est dépassée (Figure I-37, 2). Les chaînes hydrocarbonées de ces cires sont totalement rigides. Les couches cristallines A sont séparées par des zones amorphes solides B (Figure I-37, 1) composées des groupements en tête de chaîne flexibles, des groupements de substitution et de petits espaces vides interstitiels. La dimension de la zone B est déterminée par la dimension de la distribution des longueurs de chaînes hydrocarbonées et le nombre d'anomalies d'orientation. Les composés qui ne font pas partie de la zone A, soit parce qu'ils ont un bas point de fusion (composés aliphatiques à courtes chaînes), soit pour des raisons stériques (composés cycliques), constituent une zone solide amorphe, qui, lorsque la température augmente, passe en phase liquide amorphe. La zone C (Figure I-37, 1) est également une zone rigide amorphe qui correspond aux substituants ramifiés des chaînes hydrocarbonées ; chez les végétaux, la présence de ce type de zone est limitée.

La zone amorphe mobile D (Figure I-37, 1) est essentiellement composée des plus courtes chaînes qui se répartissent entre les cristaux lors des phases de cristallisation. Une partie des zones D remplissent les espaces vides entre les groupements de fin de chaîne des composés de la zone B. Si la quantité de parties D est suffisamment élevée (dépend du volume total d'espaces disponibles dans B et de la distribution de la longueur de chaînes des composés aliphatiques), il se forme des clusters à l'extérieur de la zone B. Cela dépend aussi de la température. Lorsque la température augmente, la zone variable D se développe au départ à l'intérieur des zones fixes B et se répand en dehors lorsque tous les espaces vides de B se retrouvent remplis. Les chaînes des zones D situées à l'intérieur des zones B sont plus mobiles que les chaînes des zones A ; celles situées à l'extérieur des zones B possèdent par contre une très grande liberté de mouvement et ressemblent à un liquide.

D'une espèce végétale à l'autre, les variations de la distribution des longueurs de chaînes hydrocarbonées résultent en une répartition des zones cristallines A et des zones amorphes B distinctes. Dans le cas de chaînes très longues ($n > 40$), il arrive que deux zones cristallines soient reliées, traversant ainsi des zones amorphes B (Figure I-37, 1). Une des premières conséquences concerne la cristallinité des cires qui sera plus élevée et donc une température de fusion plus élevée.

La température a un effet immédiat sur le degré d'ordre de la structure. Lorsque la température diminue, dans les zones amorphes B, les groupements en fin des chaînes cristallines les plus longues subissent des mouvements trans-gauches anormaux rapides alors que les chaînes plus courtes participent à des translations-rotations rapides. Une partie de la zone amorphe mobile D se solidifie : les plus longues chaînes deviennent alors partie intégrante de la zone cristalline tandis que les autres constituent une nouvelle zone amorphe solide. Si la température continue de baisser, la proportion d'orientations anormales des groupements de fins de chaînes dans les zones B et les réorientations par translation des courtes chaînes des zones A diminuent et le processus amorcé par les zones D est terminé. A encore plus basse température, seules persistent les triples réorientations des groupes méthyles.

Si les cires sont chauffées jusqu'à atteindre la transition hexagonale (Figure I-37, 2), les réorientations anormales des groupements de fin de chaînes dans les zones B et les réorientations par translation des zones cristallines A sont activées. Les chaînes les plus courtes des zones amorphes solides deviennent mobile : les zones amorphes mobiles D apparaissent. Juste avant la transition de phase, toutes les zones amorphes solides se sont transformées en zones amorphes mobiles. En phase hexagonale, toutes les longues chaînes subissent des rotations autour de leurs axes et les mouvements anormaux des groupements de fin de chaînes sont très nombreux. Les forces de Van Der Waals entre les molécules faiblissent et les plus courtes chaînes passent des zones cristallines vers les zones amorphes mobiles. Lorsque la fusion totale est atteinte, il n'existe qu'une unique zone amorphe mobile. En résumé, les solides amorphes fusionnent, puis les cristaux passent sous forme de solides amorphes qui fusionnent à leur tour.

La zone A est impénétrable pour la plupart des composés biologiquement actifs (exclusion pour des raisons d'encombrement stérique, solubilités faibles). Ces composés ainsi que l'eau diffusent alors dans les zones amorphes B et D et dans des régions de type liquide (Li *et al.* 2009 [113], Riederer et Schreiber 1995 [126], Reynhardt et Riederer [131]). La cutine, quant à elle, se présente dans un état de type liquide (Li *et al.* 2009 [113]).

Schreiber *et al.* en 1997 [133] ont étudié la sorption de deux solutés, l'acide octadécanoïque et le dotriacontane, dans les cires cuticulaires de feuilles de *Hordeum vulgare*. Leurs travaux ont montré que les deux solutés étaient localisés dans les zones amorphes des cires mais qu'ils ne se trouvaient pas dans les mêmes régions de ces zones (Figure I-38).

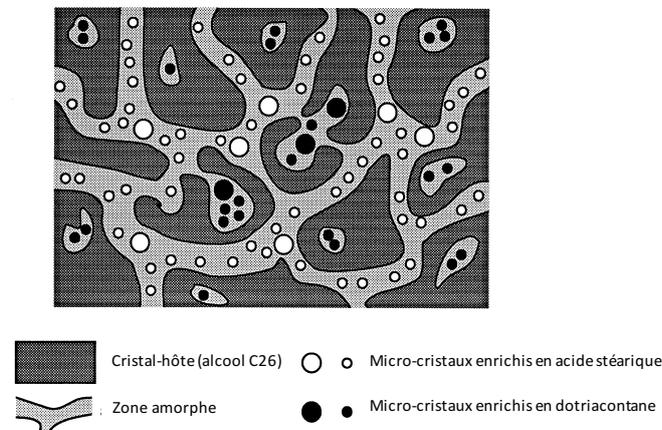


Figure I-38 : Représentation schématique de la voie de diffusion apolaire dans des cires recristallisées de feuilles de *Hordeum vulgare* d'après Schreiber *et al.* 1997 [133]

L'acide stéarique, de chaîne plus courte (C18) et possédant une fonction acide polaire, a été localisé dans un environnement d'ordre peu élevé au sein du cristal. L'ajout de mono-hexyl-éther de triéthylène-glycol comme tensioactif a augmenté la mobilité de l'acide, démontrant que les molécules de tensioactif se positionnaient exactement dans les mêmes zones que l'acide. En revanche, le dotriacontane, beaucoup plus apolaire, a été sorbé dans un environnement très différent de celui de l'acide stéarique. Différentes expériences ont conduit à l'hypothèse que le dotriacontane pouvait se sorber dans deux environnements distincts, plus ou moins rigides. L'ajout du tensioactif n'ayant pas eu d'impact sur la diffusion du dotriacontane démontre que ce dernier participe à une phase distincte à laquelle le tensioactif n'a pas accès.

2. 5. 3. Caractérisations physico-chimiques des régions amorphes et cristallines

Globalement, la cuticule des pommes peut être représentée comme un solide semi-cristallin ponctué de régions amorphes. Le caractère amorphe et cristallin de la cuticule et de ses cires cuticulaires peut être mis en évidence à partir de quatre analyses distinctes :

- l'analyse par diffraction des rayons X,
- la calorimétrie à balayage différentiel DSC,
- l'analyse infrarouge à transformée de Fourier IRTF,
- la résonance magnétique nucléaire RMN ¹³C du solide.

a- L'analyse par diffraction des rayons X

L'analyse par diffraction des RX permet de différencier les composés cristallins qui apparaissent sous la forme de pics fins lorentziens (Figure I-39) des régions amorphes qui forment des signaux plus larges et gaussiens. Il est possible de mesurer les aires des signaux afin de calculer le ratio amorphe/cristallin.

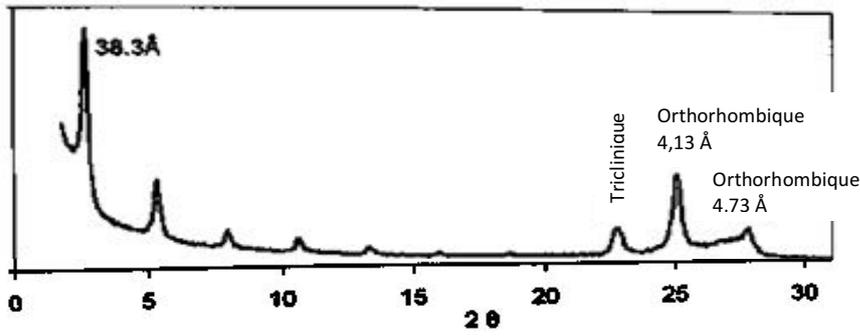


Figure I-39 : Radiogramme des cires épicuticulaires de pommes Ontario, isolées mécaniquement d'après Ensikat et al. 2006 [106]

Le ratio amorphe/cristallin est calculé comme le rapport de la somme des aires des pics gaussiens sur la somme des aires des pics lorentziens.

b- La calorimétrie à balayage différentiel

La cuticule est un solide semi-cristallin avec des régions amorphes. L'analyse par DSC montre que la cuticule et ses cires possèdent des transitions de premier ordre et de second ordre (Luque et Heredia 1994 [109], Shechter et al. 2006 [112]). Les transitions de premier ordre correspondent aux températures de fusion T_f des composés cristallins tandis que les transitions de second ordre aux températures de transition vitreuse T_g des composés amorphes. La Figure I-40 représente les thermogrammes des différents composés de la cuticule de tomate.

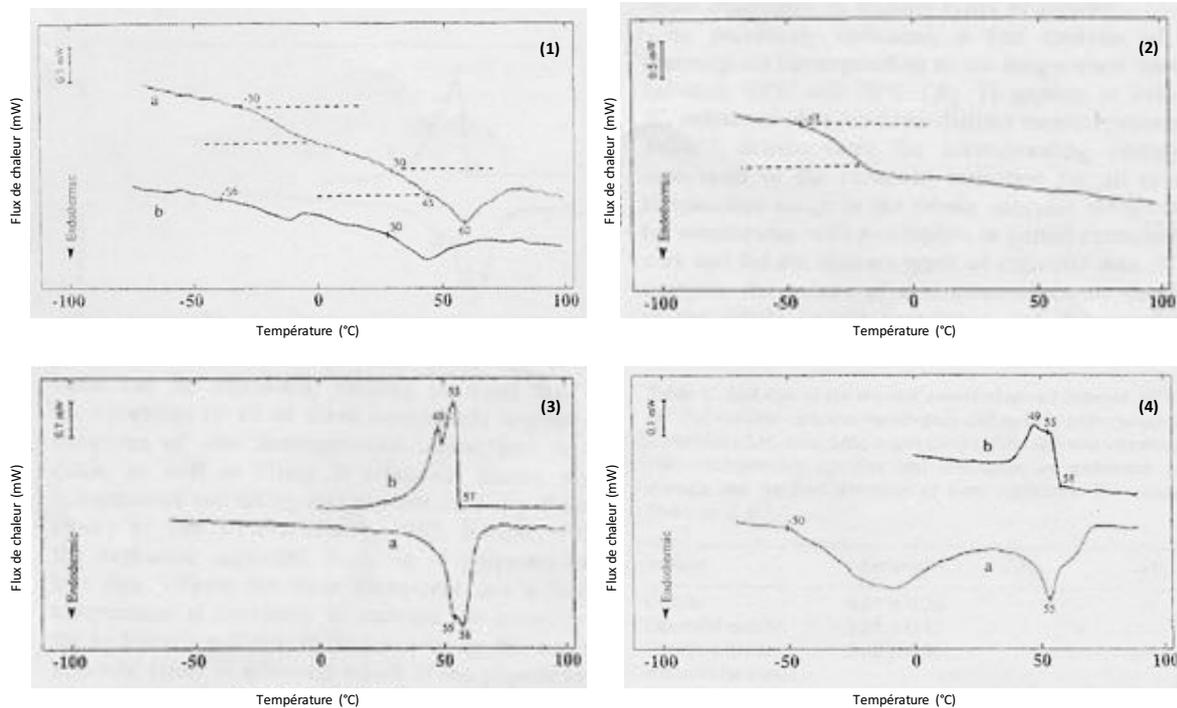


Figure I-40 : Thermogrammes des cuticules de tomates (1a) isolée, (1b) décirée, (2) de la cutine, (3) des cires épicuticulaires et (4) intracuticulaires d'après Luque et Heredia 1994 [109]

Légende : a = thermogrammes de chauffe
 b = thermogrammes de refroidissement

En comparant les thermogrammes de la cuticule isolée (1a) puis décirée (1b), on distingue deux transitions du second ordre dont la T_g de la cuticule à -30°C et une transition du premier ordre

endothermique correspondant à la fusion des cires cuticulaires ($T_f = 60^\circ\text{C}$). Après décirage, la T_g de la cuticule passe à -36°C . La T_g de la cutine est mesurée à -47°C (2). Les cires épicuticulaires extraites des peaux de tomates présentent exclusivement des transitions du premier ordre (3) tandis que le thermogramme des cires intracuticulaires montre en plus une transition de second ordre très large de -50 à $+20^\circ\text{C}$ (4).

Ces résultats démontrent que les cires épicuticulaires sont exclusivement cristallines tandis que les cires intracuticulaires sont un mélange de composés cristallins et amorphes. La cutine, composé principal des cuticules délipidées se présente comme un polymère amorphe.

c- La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

La composition de la cuticule peut être évaluée à partir de l'analyse des spectres IRTF. La caractérisation par IRTF des cuticules a montré l'existence de deux bandes fortes vers 2920 et 2850 cm^{-1} de vibration de valence CH_2 asymétrique et symétrique respectivement et de bandes de vibration de déformation CH_2 des chaînes aliphatiques des composés de la cutine, des cires et du cutane (Chen *et al.* 2008 [73], Heredia-Guerrero *et al.* 2014 [98]).

Si une modification de l'ordre conformationnel des longues chaînes alkyles intervient dans la structure de la cuticule, on observe en IR des déplacements de ces deux bandes. Un effet bathochrome (déplacement vers les longueurs d'onde plus grandes donc diminution du nombre d'onde) est le signe d'un comportement de type solide soit un gain d'ordre. Un effet hypsochrome (déplacement vers les longueurs d'onde plus petites donc augmentation du nombre d'onde) est le signe d'un comportement de type liquide.

Les spectres des différents constituants de la cuticule de pomme (Figure I-41) démontrent que :

- la présence des cires dans la peau des pommes entraîne un gain d'ordre (déplacement de la bande symétrique de 2924 à 2919 cm^{-1} et de la bande asymétrique de 2854 à 2850 cm^{-1}),
- les déplacements de la bande symétrique de 2919 à 2931 cm^{-1} et de la bande asymétrique de 2850 à 2857 cm^{-1} sont cohérents avec la nature de la cutine, polymère au comportement de type liquide, plus désordonné (Li *et al.* 2009 [113]).

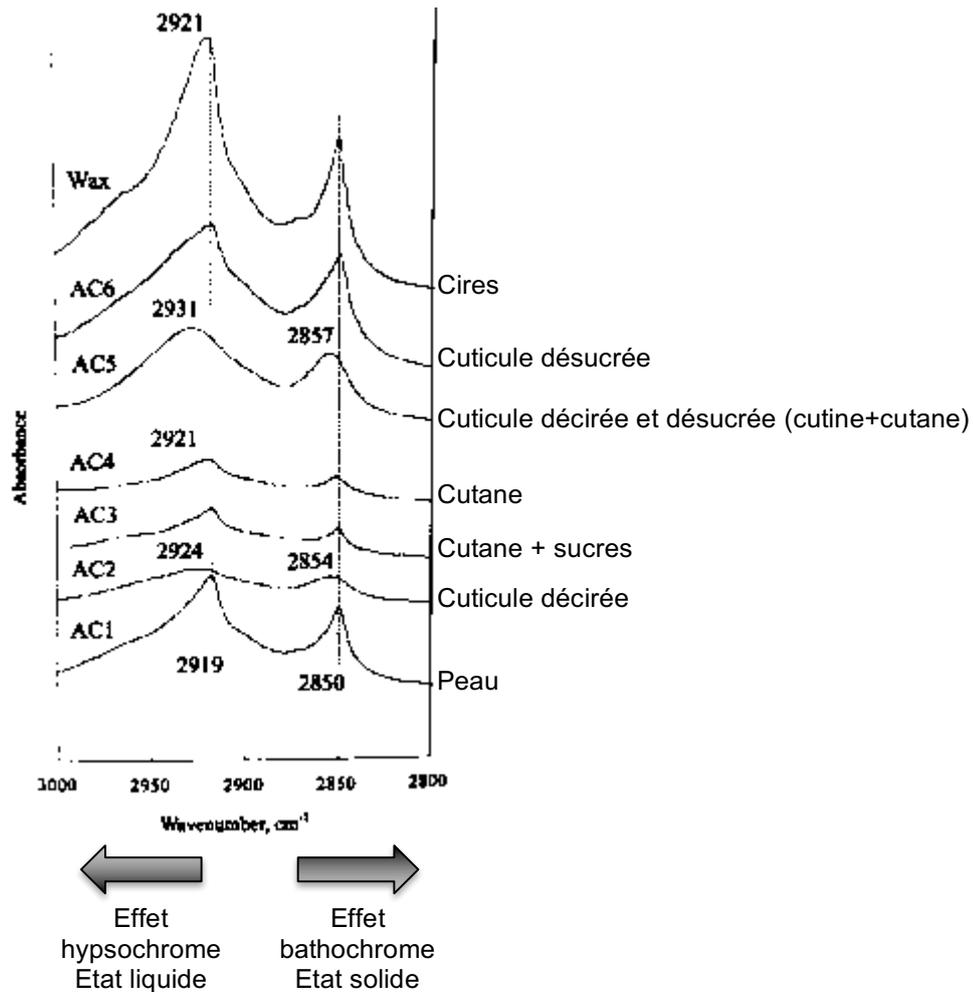


Figure I-41 : Spectres IRTF des différents constituants de la cuticule de pomme d'après Chen *et al.* 2008 [73]

d- La résonance magnétique nucléaire du ^{13}C en milieu solide

L'expérience CP-MAS permet de voir les carbones qui présentent un couplage dipolaire avec les hydrogènes. Plus le groupement CH est mobile, plus le couplage dipolaire diminue, s'exprimant par une diminution de l'intensité du signal. Si la mobilité est forte, le signal peut disparaître comme dans le cas des liquides. Les atomes de carbone des groupements CH_2 des chaînes alkyles des composés aliphatiques se distinguent par un arrangement soit ordonné (configuration trans) soit désordonné (configuration gauche) des chaînes dans l'espace, se traduisant en RMN ^{13}C du solide par une modification des déplacements chimiques. Les déplacements à 29 ppm correspondent à des chaînes alcanes désordonnées (mélange de chaînes polyméthyléniques gauche et anti) comme par exemple dans les liquides amorphes tandis que ceux à 32 ppm sont relatifs à des chaînes alcanes avec une structure linéaire polyméthylénique entièrement trans (Deshmukh *et al.* 2003 [110]). Dans de nombreux travaux (Johnson *et al.* 2007 [74], Heredia 2003 [75], Chen *et al.* 2005 [111], Shechter *et al.* 2006 [112]), le ratio des intensités des deux signaux 32/29 mesurés sur les spectres de CP-MAS uniquement est utilisé comme indicateur du ratio structures rigides/amorphes mobiles. Les structures amorphes désordonnées sont ici exclusivement réduites à des structures mobiles. L'analyse pourrait gagner en précision si la CP-MAS était corrélée à la DP-MAS.

Dans les cires extraites de la cuticule du kaki (Figure I-42), le ratio 29/32 est faible en raison du caractère cristallin des cires. Le ratio est beaucoup plus élevé pour la cuticule décirée, composée à plus de 48 % de cutine, polymère amorphe.

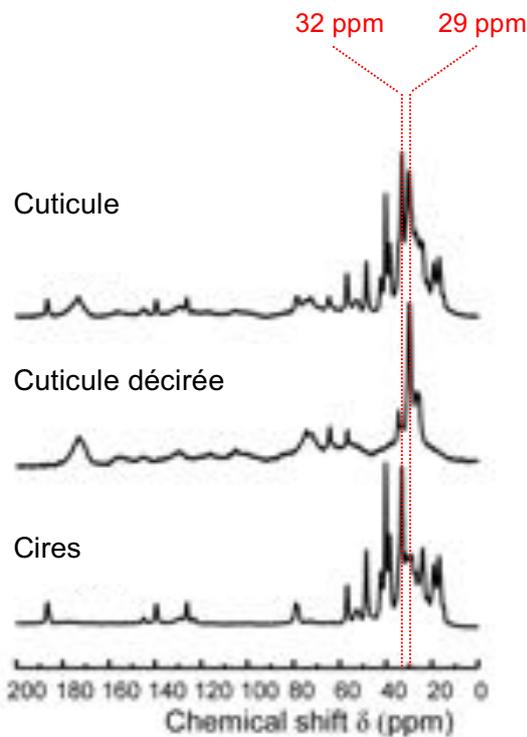


Figure I-42 : Spectres de RMN CP-MAS du ^{13}C de la cuticule et des cires du kaki d'après Tsubaki et al. 2013 [91]

2. 5. 4. Le rôle des craquelures et des lenticelles : définition de la voie de diffusion polaire

Les deux voies de diffusion existant à travers la membrane des végétaux sont schématisées sur la Figure I-43 :

- la diffusion apolaire des petites molécules polaires non chargées telles que l'eau (Schönherr 2006 [134]) et des grosses molécules lipophiles représentées par des cycles aromatiques au travers de la membrane lipidique,
- la diffusion polaire des analytes chargés représentés par les ions positifs (+) et négatifs (-) au travers d'un pore (stomate, lenticelle, craquelure).

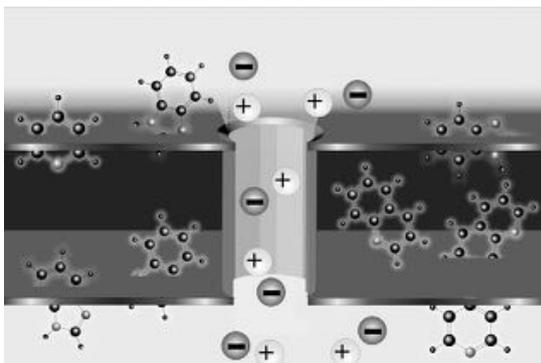


Figure I-43 : Schéma d'une membrane traversée par un pore d'après Schönherr 2006 [134]

En tant que réminiscence des stomates à la surface du fruit, les lenticelles se chargent donc de certaines de leurs fonctions, notamment des échanges gazeux et de la pénétration de substances actives extérieures (Wang et Liu 2007 [135]). Les solutés ioniques (sels de calcium, glyphosate, tous nutriments...) empruntent la voie de diffusion polaire pour pénétrer au travers de la cuticule. L'eau, même si la molécule n'est pas chargée, de par sa très petite taille, peut également passer par la voie de diffusion polaire (Schreiber 2005 [136]).

Les travaux de Maguire *et al.* en 1999 [127] sur des pommes Braeburn de Nouvelle-Zélande leur ont permis de développer un modèle mathématique reliant l'occurrence des craquelures à la variation de la perméance à la vapeur d'eau du fruit. La présence de craquelures sur les Braeburn entraîne une augmentation de la perméance de la cuticule jusqu'à un facteur 15 ! Le modèle – qui ne tient pas compte de la contribution des lenticelles et de la perméabilité de la cuticule interne – prédit que, pour des échantillons dont la perméance est très élevée, plus de 40 % de leur surface serait recouverte de craquelures. Veraverbeke *et al.* [63] ont développé en 2003 un modèle qui prend en compte tous les paramètres pouvant influencer la diffusion de la vapeur d'eau : les propriétés de diffusion de la cutine et des cires, la présence de microcraquelures et de lenticelles ouvertes ou fermées. Deux variétés de pommes récoltées en Belgique, Jonagold et Elstar sont soumises à ce modèle. Les épaisseurs des différentes couches (cires, cutine et cuticule) des peaux de Elstar sont plus importantes que celles des peaux de Jonagold. Pour les deux variétés, le modèle montre bien le rôle combiné de la cuticule intacte, des lenticelles et des craquelures sur la perte globale en eau, la perte étant plus importante chez Elstar que chez Jonagold. Toutefois, les craquelures et les lenticelles fermées ont une incidence moins importante, tandis que les lenticelles ouvertes ont l'influence la plus grande sur la perte en eau. Les lenticelles fermées caractérisées par la présence de subérine apparaissent comme une protection contre la perte d'humidité des pommes. Même si les lenticelles ne représentent pas la majorité des échanges avec l'extérieur : elles peuvent être responsables jusqu'à 20 % des pertes en eau dans certains fruits (Maguire *et al.* 1999 [127]). La cuticule reste la barrière privilégiée de ces échanges (Wang et Liu 2007 [135]).

3. Les interactions pesticides-fruits

Les végétaux accumulent les polluants *via* l'absorption par les racines des traitements appliqués au sol ou apportés par l'eau mais surtout *via* l'absorption par les voies aériennes (feuilles, fleurs, fruits, tiges) (Sabljić *et al.* 1990 [137]). La plupart du temps, les produits de traitement phytosanitaires sont appliqués par pulvérisation.

Les polluants peuvent atteindre la surface des végétaux sous trois aspects différents (Riederer 1990 [138]) :

- sous forme de vapeur,
- dissout dans des gouttelettes (aérosols),
- sous forme de particules.

La volatilisation est un phénomène physico-chimique au cours duquel le phytosanitaire passe d'une phase solide ou liquide vers une phase vapeur. Il peut s'agir soit d'une évaporation de la phase liquide, soit d'une sublimation de la phase solide (Lichiheb *et al.* 2015 [139]). La volatilisation depuis le végétal est plus importante que depuis les sols car l'adsorption des molécules par le végétal est plus faible que dans le sol, où les substances humiques constituent de vrais séquestrants. Le

phénomène de volatilisation rentre en compétition avec la pénétration foliaire, la photodégradation et le lessivage par les pluies. Suite à cette volatilisation, le phytosanitaire peut atteindre le végétal sous forme de dépôt sec.

3. 1. La pénétration des molécules actives des produits phytosanitaires à la surface des végétaux

La pénétration des intrants autres que les électrolytes, c'est-à-dire les composés organiques lipophiles tels que les pesticides, se fait exclusivement par la cuticule (Sabljic *et al.* 1990 [137]).

Tandis que les modèles classiques de relation quantitative structure-activité reposent sur les coefficients de partage cuticule / eau $K_{MC/E}$ ($\log K_{MC/E} = 0,057 + 0,970 \cdot \log K_{O/E}$) et la solubilité dans l'eau S_E ($\log K_{MC/E} = 1,118 - 0,569 \cdot S_E$), Sabljic *et al.* en 1990 [137] proposent un modèle prédisant les coefficients de partage cuticule-eau à partir des indices de connectivité moléculaire, indices topographiques ou descripteurs structuraux décrivant et quantifiant la taille, la forme, le degré de ramification et la cyclicité des molécules. Leurs travaux démontrent que les coefficients de partage cuticule-eau sont très fortement corrélés à la dimension moléculaire :

- plus les molécules ont des volumes molaires importants et plus grande est l'affinité pour la cuticule, toutefois tous les groupements d'une molécule ne participent pas de façon identique à cette affinité,
- certains groupements y contribuent : substituants chlorés, chaînes hydrocarbonées, cycles aromatiques,
- tandis que les liaisons contenant un atome d'oxygène ou d'azote et la présence de groupements hydroxyles aliphatiques ne sont pas favorables.

3. 2. Le mécanisme de la pénétration

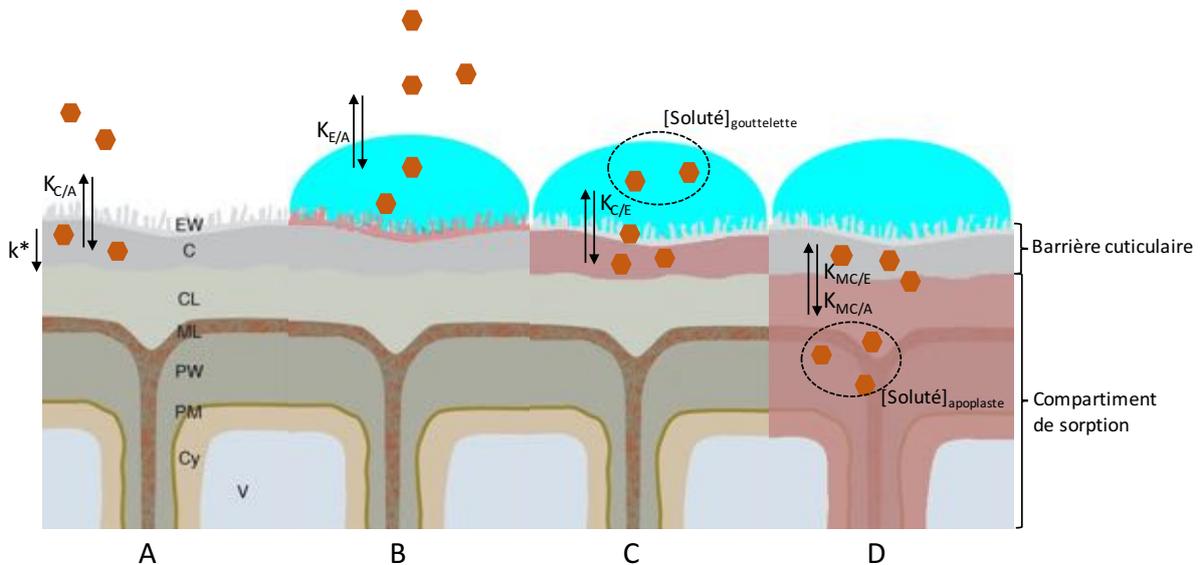
Les solutés pénètrent la surface des végétaux selon un phénomène physique de diffusion sous l'effet d'un gradient de potentiel chimique depuis la couche la plus externe – les cires épicuticulaires – jusqu'au cytoplasme des cellules épidermiques. Le gradient de potentiel chimique est le produit du coefficient de partage et du gradient de concentration (Schönherr et Baur 1994 [140]). Il constitue, avec la mobilité des solutés, le taux de pénétration.

La surface des végétaux peut être schématisée par deux parties distinctes (Figure I-44) (Baur *et al.* 1996 [117], Schönherr et Baur 1994 [140]) :

- la membrane cuticulaire, véritable barrière formée par les cires et la cutine représentant 10 % de l'épiderme,
- le compartiment de sorption, soit 90 % de l'épiderme, représenté par les cellules épidermiques (membranes ML/PW/PM et cytoplasme Cy), riches en polysaccharides.

La capacité de sorption et la mobilité des espèces sont limitées dans la membrane cuticulaire alors qu'elles sont beaucoup plus élevées dans les cellules épidermiques constituant le compartiment de sorption (Schönherr et Baur 1994 [140]). La perméabilité de la membrane cuticulaire est limitée par la présence des cires. En effet, la sorption et la diffusion des molécules dans les zones amorphes des cires est limitée par la présence des structures cristallines solides à température ambiante (Buschhaus et Jetter 2011 [71], Chen *et al.* 2008 [73], Li *et al.* 2010 [113]). Les cires intracuticulaires

sont les plus imperméables (Maguire 1998 [56]). Les cires épicuticulaires n'ont aucune incidence sur la perméabilité de la membrane et le taux de pénétration des composés. Elles n'ont d'autre fonction que d'influer sur la mouillabilité de la surface des végétaux, entraînant soit une mauvaise rétention soit une diffusion des gouttelettes d'aérosols (Buchholz 2006 [141]). Toutefois, elles facilitent la pénétration des molécules très lipophiles (Baker *et al.* 1992 [142]). La cutine (= cuticule délipidée) est en revanche un polymère amorphe possédant des capacités de sorption très importante (Chen *et al.* 2008 [73], Li et Chen 2009 [113]). La cuticule délipidée est de 20 à 1500 fois plus perméable que la cuticule non délipidée (Maguire 1998 [56], Baur *et al.* 1996 [117]).



Légende :

- Soluté
- Gouttelette
- EW = cires épicuticulaires
- C = cuticule propre
- CL = couche cuticulaire
- ML = lamelle moyenne
- PW = paroi primaire
- PM = membrane plasmique
- Cy = cytoplasme
- V = vacuole

- k^* = mobilité du soluté
- $K_{C/A}$ = coefficient de partage du soluté entre les cires et l'air atmosphérique
- $K_{E/A}$ = coefficient de partage du soluté entre la gouttelette et l'air atmosphérique
- $K_{C/E}$ = coefficient de partage du soluté entre la gouttelette et les cires de la cuticule
- $K_{M/C/E}$ = coefficient de partage du soluté entre la matrice polymérique et la phase aqueuse de l'apoplaste des cellules épidermiques (parois pectocellulosiques membranaires – ML, PW et PM – et espaces vides intercellulaires) et du cytoplasme (Cy)
- $K_{M/C/A}$ = coefficient de partage du soluté entre la matrice polymérique et l'air intercellulaire
- $[Soluté]_{gouttelette}$ = concentration du soluté dans la formulation
- $[Soluté]_{apoplaste}$ = concentration du soluté dans la phase aqueuse de l'apoplaste

Figure I-44 : Schéma de pénétration des molécules bioactives à la surface des végétaux selon le chemin de diffusion apolaire d'après Pollard *et al.* 2008 [60], Buchholz 2006 [141], Riederer 1990 [143]

N.B. L'apoplaste désigne les zones extracellulaires formées par les parois pectocellulosiques et les espaces vides entre les cellules.

La membrane cuticulaire est un biopolymère pour lequel s'appliquent les principes généraux de sorption de l'eau et de transport des solutés dans les polymères (Cotugno *et al.* [144]). Après dissolution à la surface du polymère, les solutés pénètrent dans la membrane en trois étapes successives majeures (Wang et Liu 2007 [135], Buchholz 2006 [141]) détaillées ci-après.

3. 2. 1. Le premier contact : les cires épicuticulaires

La pénétration des actifs débute dès l'instant où la gouttelette d'aérosol phytosanitaire entre en contact avec la surface extérieure de la barrière cuticulaire, c'est-à-dire au niveau des cires épicuticulaires EW (Figure I-45).

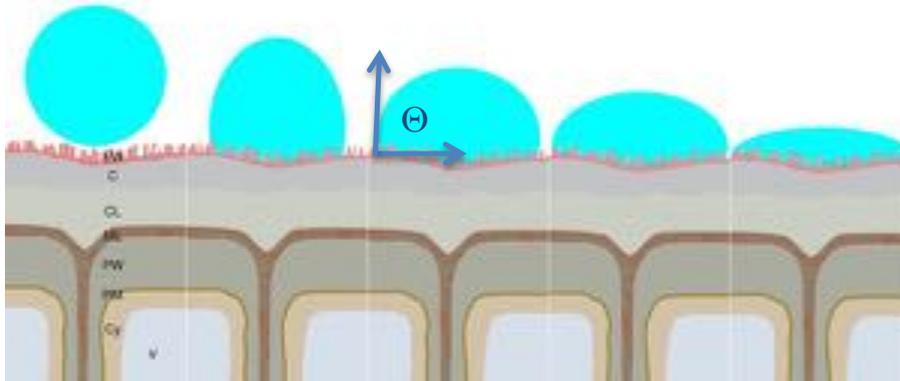


Figure I-45 : Représentation de la mouillabilité de l'épiderme des végétaux par la mesure de l'angle de contact entre la gouttelette d'aérosol et les cires épicuticulaires

La composition chimique des cires et la microstructure cuticulaire affectent la mouillabilité et vraisemblablement le dépôt des produits chimiques, des spores... (Belding *et al.* 1998 [81]).

Une partie des solutés se dissout dans les cires épicuticulaires tandis qu'une autre se volatilise dans l'atmosphère ($K_{E/A}$, Figure I-44, B).

3. 2. 2. Etape 1 de la pénétration : la sorption des molécules

La sorption des molécules dans les cires cuticulaires intervient plus particulièrement dans les parties amorphes des cires intracuticulaires ($K_{C/E}$, Figure I-44, C) (Buchholz *et al.* 1998 [118], Riederer et Schreiber 1995 [126], Schreiber et Schönherr 1993 [145]). Cette étape ne peut avoir lieu qu'en milieu liquide et est donc directement affectée par l'évaporation de l'eau des gouttelettes et la ré-humidification des dépôts secs solides. Elle dépend de 3 catégories de facteurs :

- les propriétés physico-chimiques de l'actif ($K_{C/E}$, pKa, hydrosolubilité et pression de vapeur) ;
- les conditions abiotiques et la formulation chimique (température, humidité résiduelle, pH et additifs)
- les paramètres modifiant la mobilité de l'actif (espèce végétale, volume molaire de l'actif, température, accélérateurs).

La volatilisation du soluté depuis la cuticule vers l'atmosphère ($K_{C/A}$, Figure I-44, A), la photodégradation et le lessivage par les pluies entrent en compétition avec la sorption.

3. 2. 3. Etape 2 de la pénétration : la diffusion des molécules

Les molécules traversent l'épaisseur de la membrane par diffusion selon un chemin plus ou moins complexe en fonction de nombreux facteurs relevant des :

- conditions abiotiques (température élevée = meilleure diffusion des solutés lipophiles, humidité résiduelle),
- propriétés physico-chimiques de la formulation telles que :
 - o les propriétés du soluté (coefficients de partage, pKa, hydrosolubilité, pression de vapeur, volume molaire),
 - o les propriétés des additifs passifs non pénétrants tels que tensioactifs, humectants (solvatation, partage, prévention de la cristallisation pour optimiser la pénétration de l'actif)
 - o les propriétés des additifs actifs pénétrants tels que les plastifiants (concentration dépendant et synergie avec l'actif, diminue l'énergie d'activation nécessaire à la diffusion en diminuant la viscosité des cires amorphes et/ou la longueur du trajet l_{BC} de l'actif),
 - o les propriétés de la formule (pH),
- caractéristiques de l'espèce végétale telles que :
 - o le ratio cires amorphes / cires cristallines (nature et arrangement spatial, sélectivité de taille des solutés),
 - o le degré de polymérisation de la cutine qui affecte également la mobilité k^* des solutés.

3. 2. 4. Etape 3 de la pénétration : la désorption des molécules

La dernière étape consiste en la désorption des molécules à la surface interne de la cuticule, vers les cellules épidermiques et l'air intercellulaire ($K_{MC/E}$ et $K_{MC/A}$, Figure I-44, D) (Mota-Sanchez *et al.* 2012 [146]). Les molécules se désorbent sur la surface externe des parois des cellules épidermiques, puis pénètrent jusqu'à la surface interne et atteignent le cytoplasme (Wild *et al.* 2004 [147]).

3. 2. 5. Les coefficients de perméance et de diffusion des cuticules

La perméabilité des cuticules à l'eau, aux espèces ioniques, aux composés polaires, aux nutriments, aux régulateurs de croissance, aux fongicides, insecticides et herbicides systémiques est plus ou moins faible (Buchholz *et al.* 1998 [118]).

D'un point de vue théorique, la perméabilité P d'une membrane est proportionnelle à la mobilité – évaluée par le coefficient de diffusion D – et à la solubilité d'un composé dans cette membrane – évaluée par le coefficient de sorption S . Elle est liée au coefficient de partage cuticule-eau $K_{MC/E}$ – et est inversement proportionnelle à l'épaisseur de la membrane Δx (Equation 3) (Baur *et al.* 1996 [117], Buchholz *et al.* 1998 [118], Buchholz 2006 [141]) :

$$P = D \cdot S = D \cdot \frac{K_{MC/E}}{\Delta x} \quad (3)$$

D représente la vitesse à laquelle un soluté peut se mouvoir dans la membrane et est considérablement affecté par la taille moléculaire et la forme des solutés. Le coefficient de partage

octanol/eau $K_{O/E}$ des solutés est une mesure de la taille moléculaire : pour une famille chimique donnée, le $\log K_{O/E}$ est une fonction linéaire du volume molaire (Hansen 2012 [148]). S représente la quantité de soluté dissout. Il détermine le gradient de concentration du soluté au travers de la membrane et par conséquent la force motrice à la base du transport de masse. Plus la solubilité est élevée, plus le gradient est grand et, pour un même coefficient de diffusion D , le transport de masse sera proportionnellement plus grand. Selon la théorie de Hansen, plus la distance HSP entre un solvant et un polymère est faible, plus le gradient de concentration est élevée et plus le coefficient de diffusion est grand (Hansen 2000 [149]). La distance Ra entre deux composés (1) et (2) est évaluée à partir de l'équation (4) :

$$Ra^2 = 4(\delta_{D1} - \delta_{D2})^2 + (\delta_{P1} - \delta_{P2})^2 + (\delta_{H1} - \delta_{H2})^2 \quad (4)$$

dans laquelle δD , δP et δH représentent les paramètres de dispersion, de polarité et de liaison hydrogène respectivement. Le facteur 4 a été ajouté de façon à représenter les données de solubilité sous la forme d'une sphère englobant les solvants miscibles. En remplaçant le facteur 4 par un facteur 2, la région de solubilité devient sphérique, ce qui contribue à une meilleure représentation en 2D.

Les membranes cuticulaires sont inhomogènes. Le coefficient de diffusion réel D est fonction de la longueur du chemin de diffusion du soluté (Baur *et al.* 1996 [117], Buchholz *et al.* 1998 [118]). Le taux de pénétration cuticulaire J est exprimé par l'équation (5) (Buchholz 2006 [141]) :

$$J = k^* \cdot l_{BC} \cdot (K_{C/E} \cdot [\text{Soluté}]_{\text{gouttelette}} - K_{MC/E} \cdot [\text{Soluté}]_{\text{apopalste}}) \quad (5)$$

dans laquelle, l_{BC} représente la longueur du chemin de diffusion de la barrière cuticulaire BC.

La quantité, la taille, l'arrangement spatial et la direction des cristaux de cires cuticulaires (plaquettes parallèles ou perpendiculaires à la surface, etc...) ponctuant les cires amorphes perméables régissent le chemin que le soluté va devoir emprunter pour franchir la barrière. Les cires cristallines ont une incidence majeure sur la diffusion des solutés à travers la membrane (Baur *et al.* 1996 [117]). La longueur du chemin de diffusion est supérieure à la simple épaisseur de la barrière cuticulaire. Elle dépend de la structure moléculaire des cires qui rend le chemin de diffusion plus ou moins tortueux, plus particulièrement de la longueur des chaînes des molécules (Figure I-37, 1). Plus la longueur de chaîne augmente, plus la cristallinité augmente, conduisant à des températures de fusion des cires plus élevées d'une part et plus l'arrangement spatial entre cires amorphes et cristallines devient complexe, conduisant à un trajet plus long d'autre part. La mobilité globale des solutés en est affectée. Plus le chemin est long et compliqué, plus le coefficient de diffusion sera petit et donc la mobilité du soluté réduite (Bauer et Schönherr 1992 [116], Baur *et al.* 1996 [117], Buchholz *et al.* 1998 [118]).

La mobilité k^* varie en fonction des espèces végétales (sélectivité de taille) et elle diminue lorsque le volume molaire V_x du soluté x augmente. La relation entre k^* et V_x est une fonction logarithmique dont l'équation (6 ou 7) est de type linéaire :

$$\log k^* = \log k^{*0} - \beta' \cdot V_x \quad (6)$$

$$D = D^0 \cdot e^{-\beta' \cdot V_x} \quad (7)$$

où k^{*0} représente la mobilité d'un soluté hypothétique de volume molaire nul, D^0 est le coefficient de diffusion d'un soluté hypothétique de volume molaire nul et β' la sélectivité de taille de la membrane

cuticulaire (Baur *et al.* 1996 [116], Buchholz *et al.* 1998 [117], Buchholz 2006 [140], Schreiber 2006 [150]). Ces paramètres sont indépendants des propriétés du soluté (taille ou lipophilicité) et sont caractéristiques de la membrane cuticulaire. D_0 est relié à la phase cristalline des cires déterminant le volume d'exclusion pour la diffusion, tandis que β' est corrélé à la phase amorphe dans laquelle a lieu la diffusion. Si D_0 diminue, la cristallinité des cires augmente, si β' diminue, la sélectivité de taille augmente. La variation de la sélectivité de taille β' entre les espèces végétales pour un soluté donné ne semble pas significative. Mais c'est une fonction linéaire décroissante de la température : plus la température augmente, plus β' diminue. Par conséquent, seul k^{*0} est responsable des différences variétales car il représente la tortuosité du chemin de diffusion (Buchholz *et al.* 1998 [118]).

La solubilité d'un composé est corrélée à sa lipophilicité, mesurée par le coefficient de partage cuticule/eau $K_{MC/E}$. $K_{MC/E}$ est équivalent au coefficient de partage octanol-eau (Schönherr 2006 [134]). En réalité, aux faibles concentrations, $K_{MC/E}$ est similaire à $K_{C/E}$, mais lorsque les concentrations augmentent significativement, $K_{MC/E}$ tend vers 1 car les sites de la cuticule sont saturés (Schönherr 2006 [134]). Dans la réalité, les concentrations sont rarement élevées. $K_{MC/E}$ est supérieur au coefficient de partage cires-eau $K_{C/E}$ de plusieurs facteurs – entre 2 et 10 selon les espèces et les solutés (Schreiber 2006 [150]). Or les cires sont un mélange de phases amorphes et cristallines tandis que la cutine est un polymère amorphe uniquement donc totalement perméable. Cette différence de structures moléculaires explique les différences de sorption entre les cires et la cutine puisque la sorption et la diffusion interviennent uniquement dans les zones amorphes (Schreiber 1995 [130]).

Le volume molaire, la lipophilicité et la structure chimique des solutés affectent la perméabilité de la membrane. La perméabilité augmente lorsque le coefficient de partage augmente : la perméabilité des cuticules est très élevée pour des composés extrêmement lipophiles tels que des alcools à longue chaîne et des acides gras (Buchholz *et al.* 1998 [118]). En revanche, elle devient très faible pour les composés polaires non électrolytes, les espèces ioniques et les composés tels que les acides aminés et le glucose qui ont des coefficients de partition et une solubilité dans les cires cuticulaires et la cutine très faibles. Li *et al.* ont démontré que pour les contaminants polaires organiques tels que les chlorophénols, les cires ne sont pas le principal lieu de sorption dans la cuticule des pommes (Li *et al.* 2012 [151]). Dans le cas des composés organiques polaires, c'est la cutine qui intervient majoritairement et la sorption augmente avec le coefficient de partage octanol-eau des solutés. Le mécanisme principal de la sorption repose également sur des interactions hydrophobes : plus le coefficient de partage octanol-eau augmente, plus la contribution des composés lipophiles entrant en jeu dans la sorption (cutine > cires > cutane, classés par ordre décroissant d'importance) augmente, en revanche, plus la contribution des sucres polaires diminue.

3. 3. Les paramètres pouvant affecter la pénétration : rôle des plastifiants

La pénétration des solutés dépend de quatre groupes de facteurs (Wang et Liu 2007 [135], Sabljic *et al.* 1990 [137], Lichiheb *et al.* 2015 [139]) :

- les paramètres de pulvérisation (pression et diamètre des gouttelettes),
- les caractéristiques physico-chimiques liées à l'espèce végétale (stade de développement, caractéristiques physico-chimiques de la cuticule qui vont influencer la mobilité du phytosanitaire à l'intérieur de celle-ci telles que la sélectivité de taille, la tortuosité du chemin de diffusion,

- les propriétés physico-chimiques des molécules de phytosanitaires (lipophilicité, solubilité du pesticide dans la membrane identifiée par le coefficient de partage cuticule-eau ($K_{MC/E}$) ou gradient de concentration du pesticide à travers la surface du végétal, volume molaire, formulation *i.e.* nature et concentration des adjuvants),
- les conditions climatiques (température élevée = meilleure diffusion des molécules lipophiles).

La diffusion à travers les tissus végétaux est fondamentale pour la pénétration foliaire des fongicides et insecticides systémiques, des régulateurs de croissance et défoliants...appliqués directement sur les feuilles. La présence d'adjuvants peut augmenter ou parfois inhiber l'assimilation des substances actives. Ce phénomène de diffusion concerne les cires épicuticulaires, la cuticule et enfin la membrane plasmique des cellules de l'épiderme puisque la pénétration cuticulaire consiste en une sorption du pesticide sur la cuticule suivie d'une diffusion au travers et enfin d'une désorption de la cuticule vers les cellules sous-jacentes.

3. 3. 1. La surface des végétaux

La topographie de surface des végétaux joue un rôle de premier ordre dans l'assimilation des pesticides (Wang et Liu 2007 [135]) :

- les cires épicuticulaires existant sous deux formes, amorphe et cristalline, constituent la première barrière, la plus efficace en général,
- la cutine, couche fine continue d'épaisseur variant de 0,1 à 10 μm , essentiellement constituée de lipides synthétisés par les cellules épidermiques sur leurs parois extérieures. Sa perméabilité est liée à la nature des espèces végétales et à leur stade de développement mais ne dépend pas de son épaisseur. Les molécules hydrophiles comme lipophiles peu ou pas volatiles (électrolytes polaires et composés organiques non électrolytes avec des pressions de vapeur faibles incluant la plupart des ingrédients actifs et des adjuvants des formulations pesticides) peuvent diffuser au travers,
- les stomates, lenticelles et microcraquelures dans lesquels vont pénétrer les solutés plus volatils selon leur degré de lipophilicité. Toutefois, les solutions de pesticides peuvent s'y infiltrer si leur tension de surface est inférieure à 23 mN/m.

3. 3. 2. Les propriétés physico-chimiques des matières actives

Les molécules dont la taille est supérieure à 1 kDa sont discriminées dès le départ car elles ne peuvent ni entrer ni naviguer entre les cellules végétales par les plasmodesmes (Figure I-8). La plupart des molécules de pesticides ont des masses comprises entre 100 et 500 Da (Tableau I-10). Dès lors, l'assimilation des molécules actives n'est plus, à ce stade, un problème de taille moléculaire, d'autant plus que les adjuvants des formulations de pesticides peuvent minimiser les effets de taille. La lipophilicité semble donc être le paramètre essentiel régissant la diffusion. Les composés dont le coefficient de partage octanol/eau est négatif sont considérés comme hydrophile tandis que ceux dont le coefficient de partage est positif sont lipophiles.

3. 3. 3. Les formulations phytosanitaires

Les formulations phytosanitaires doivent regrouper certaines propriétés physico-chimiques élémentaires pour faciliter la pénétration dans le végétal (Cf. § 1. 6. 2.). La concentration en matières actives et le pH sont très importants. De nombreux herbicides sont des acides faibles. A faible pH, la forme non dissociée prédomine : le caractère est donc plus lipophile mais l'hydrosolubilité diminue. La voie humide doit être privilégiée car lorsque les gouttelettes sèchent, la matière active cristallise et devient indisponible pour l'assimilation.

Les tensioactifs, les huiles et les sels d'ammonium sont les adjuvants les plus utilisés pour l'optimisation de la pénétration des molécules actives.

a- Les tensio-actifs

La nature du tensioactif en relation avec l'espèce végétale peut augmenter ou même inhiber l'assimilation de la substance active. Les tensioactifs organosiliconés, en raison de leur tension de surface extrêmement faible, provoquent une infiltration instantanée des solutions aqueuses d'herbicides comme le glyphosate par la voie de diffusion polaire tandis qu'en présence de tensioactifs non siliconés, le glyphosate diffuse au travers de la cuticule (Liu 2004 [152]).

Les plus répandus sont les tensioactifs non ioniques : éthoxylates d'alcool linéaire, éthoxylates d'alkylphénol et trisiloxane éthoxylates (Wang et Liu 2007 [135]). Les groupements polaires de la plupart des tensioactifs non ioniques sont des groupements éthoxylés (OE) bien que remplacés de plus en plus par des sucres ou des polyols, plus écologiques. Les tensioactifs éthoxylés peuvent agir sur la fluidité des cires cuticulaires, sur la perméabilité à l'eau de la cuticule, sur la propagation des gouttelettes, leur temps de séchage et posséder, s'il en est, un pouvoir humectant (Ramsey *et al.* 2005 [153]). En règle générale, les tensioactifs avec une faible proportion de OE améliorent la pénétration des pesticides lipophiles ($\log K_{O/E} > 3$) en fluidifiant les cires cuticulaires et en augmentant la perméabilité à l'eau, tandis que ceux avec une forte proportion de OE augmentent la pénétration des pesticides plutôt hydrophiles ($\log K_{O/E} < 0$) en augmentant la perméabilité à l'eau de la cuticule (Ramsey *et al.* 2005 [153]). D'autres composés comme les esters n-alkyliques, les esters dialkyls de l'acide phtalique, de l'acide adipique et de l'acide subérique, le naphthalène, l'acide octanoïque et l'octanol jouent le rôle d'accélérateurs de mobilité des solutés dans les cires cuticulaires (Baur *et al.* 1996 [117], Riederer et Schreiber 1995 [126], Schreiber 2006 [150], Schönherr 1993 [154]). En 1998, Mouloungui et Gauvrit ont mis en évidence que les esters d'acides gras et en particulier les monoglycérides et les esters de tétraéthylène glycol amélioraient significativement la pénétration foliaire des herbicides [155]. Ces accélérateurs sont des solvants qui pénètrent dans la cuticule : ils sont dits « actifs » (plastifiants). Les accélérateurs « passifs » sont des solvants (tensioactifs, humectants) qui restent à la surface de la cuticule et qui affectent les partages entre l'actif, les adjuvants avec les résidus de formulation et les cires cuticulaires (Buchholz 2006 [141]). Les accélérateurs actifs diminuent la viscosité des cires amorphes et/ou la complexité du chemin à parcourir par le soluté mais ne solubilisent pas les cires cristallines (phénomène réversible) : ils diminuent le paramètre β de sélectivité de taille de la phase amorphe des cires mais ne modifient pas D_0 relié à la phase cristalline (Cf. équation 7). Leur efficacité est dépendante de leur nature et de leur concentration, de la température, de la taille du soluté et de l'espèce végétale. Dans une expérimentation mettant en œuvre une désorption unilatérale des solutés depuis les couches les plus internes vers les couches les plus externes de la membrane cuticulaire (Figure I-46), il a été

démonstré qu'au-dessus de la concentration micellaire critique CMC, les molécules d'accélérateurs organisées en micelles forment de nouveaux compartiments de sorption en phase aqueuse qui entrent en concurrence avec les cires pour la sorption des solutés tandis que les molécules d'accélérateurs isolées s'adsorbent sur les cires en même temps que les solutés se désorbent (Schreiber 1995 [130]).

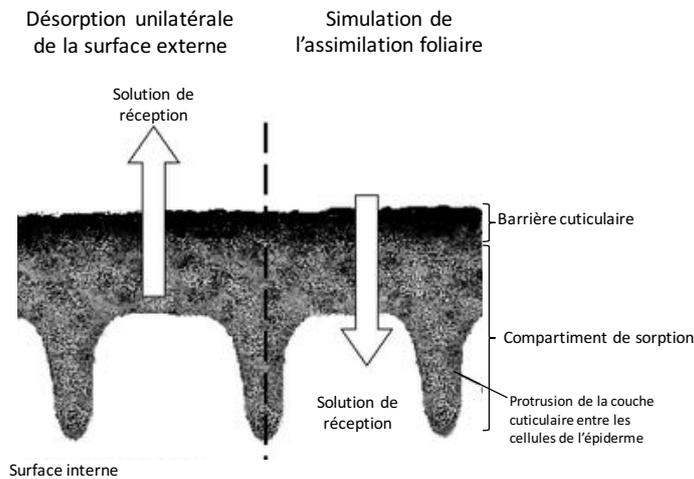


Figure I-46 : Schéma de l'expérience de désorption unilatérale de la couche externe de la cuticule des végétaux d'après Buchholz 2006 [141]

Les coefficients de partage cuticule-eau $K_{CM/E}$ des solutés diminuent avec l'augmentation de la concentration en accélérateur. Dans la membrane cuticulaire, la diffusion des solutés n'a pas lieu depuis les couches internes vers les couches externes, mais des couches externes vers les couches les plus internes de l'épiderme. Bauer et Schonherr en 1992 [116] ont observé que les flux internes \rightarrow externes sont 8 à 29 % plus élevés que dans le sens réel de diffusion car les $K_{CM/E}$ sont légèrement plus grands sur les surfaces internes des membranes que sur les surfaces externes. En général, les énergies d'activation de diffusion (ou enthalpie de diffusion) les plus basses correspondent à des charges très importantes d'accélérateurs. L'accélérateur et le composé actif agissent en synergie au niveau de la barrière cuticulaire pour optimiser la mobilité de l'actif, ce phénomène est réversible en ce sens qu'en l'absence d'accélérateur, l'actif retrouve sa mobilité initiale (Schreiber 1995 [130], Buchholz 2006 [141]). Les accélérateurs actifs augmentent significativement les coefficients de diffusion D des solutés ainsi que leur propre coefficient à travers les membranes lorsque leur mobilité est inférieure ou égale à celle des solutés (Schreiber 1995 [130]). Par exemple, le tributyl phosphate rend les cires amorphes plus plastiques et augmente ainsi le volume accessible à la diffusion des solutés (Buchholz et Schönherr 2000 [119]). L'énergie d'activation est fortement réduite et les solutés beaucoup plus mobiles. Ces effets sont réversibles une fois le tributyl phosphate désorbé de la membrane. Selon une théorie développée dans les années 50 (Zielinski et Duda 1992 [156]), un soluté nécessite un espace entre les chaînes d'un polymère pour y diffuser correctement, l'énergie nécessaire étant assurée par les mouvements browniens du soluté lui-même. La diffusion du soluté est donc limitée par le mouvement des chaînes adjacentes du polymère. A une température donnée, un polymère présente une distribution caractéristique de ces volumes libres temporaires. En augmentant la température, leur distribution se modifie et des volumes plus larges se créent (rupture de certaines liaisons intermoléculaires) au détriment des petits volumes (Buchholz 2006 [141]). Le plastifiant agirait au niveau des espaces libres en diminuant la température de transition vitreuse du polymère, augmentant ainsi sa flexibilité (Cf.

§ 2. 5. 3. b-). Chen *et al.* en 2008 [73] ont analysé par DSC sept échantillons issus du fractionnement chimique des peaux de pommes. Les résultats (Tableau I-20) montrent que :

- les polysaccharides jouent un rôle de plastifiant de la cutine en diminuant sa T_g (de - 25°C à - 44°C et de - 30°C à - 42°C),
- les polysaccharides jouent le rôle d'anti-plastifiant des cires en augmentant leur T_g (de 41°C à 44°C),
- les cires de la cuticule désucriée jouent le rôle d'anti-plastifiant de la cutine en augmentant sa T_g (de - 30°C à - 25°C) alors qu'elles sont plastifiantes de l'épiderme (T_g de - 42°C à - 44°C),
- la cutine joue le rôle de plastifiant des cires en diminuant leur T_g (de 45°C à 41°C).

Echantillon	Composition (%)				T _g (°C)		
	Cires	Cutine	Sucres	Cutane	Cutine	-	Cires
Epiderme	44,7	34,6	13,2	7,5	- 44	-	44
Cuticule décirée	-	62,6	23,9	13,6	- 42	12,8	-
Cutane + sucres	-	-	63,8	36,2	-	-	-
Cutane	-	-	-	100	- 33	-	-
Cuticule décirée et désucriée (cutine+cutane)	-	82,2	-	17,8	- 30	-	-
Cuticule désucriée	51,5	39,9	-	8,6	- 25	-	41
Cires	100	-	-	-	-	-	45

Tableau I-20 : Analyse de la composition chimique et des variations de transition vitreuse par DSC de sept extraits d'épiderme de pommes d'après Chen *et al.* 2008 [73]

Dans l'épiderme, les effets plastifiants ou anti-plastifiants sont complexes car toutes les molécules sont présentes à la fois dans des proportions variables. Li *et al.* 2009 ont comparé l'effet plastifiant du dodecylbenzènesulfonate de sodium (SDBS) dans les cuticules de tomates et de pommes. La sorption du SDBS est plus faible dans la cuticule des pommes car elle contient plus de cires (environ 45 % massique) et moins de cutine (environ 35 % massique) que la tomate (6 % et 70 % massique respectivement) (Li *et al.* 2009 [157]). La sorption du 1-naphtol et du naphthalène dans les cuticules de pommes en présence de SDBS est faible en dépit d'une large gamme de concentrations en SDBS appliquées. L'effet anti-plastifiant des cires de la cuticule de pomme dépasse l'effet plastifiant du SDBS. Par conséquent, le SDBS n'est pas un plastifiant assez puissant pour ramollir les cires dans la cuticule.

En résumé, pour qu'un tensioactif puisse diminuer la T_g des cires des cuticules de pommes, il faut qu'il :

- pénètre dans la cuticule, étape limitée par la présence en quantité importante des cires (augmentation de la T_g de la cuticule),
- possède des propriétés plastifiantes supérieures à l'effet anti-plastifiant des cires.

En RMN du ¹³C solide, les cuticules sont généralement et systématiquement analysées par CP-MAS (Cf. 2. 5. 3. d-), dans laquelle le ratio des intensités des deux signaux 32/29 est utilisé comme indicateur du ratio structures rigides/amorphes mobiles. Les structures amorphes désordonnées sont ici exclusivement réduites à des structures mobiles.

En présence de solutés (polluants, plastifiants...), les travaux montrent qu'une modification du ratio 32/29 est observable en CP-MAS, à condition que ces solutés ne présentent pas dans leur structure

une longue chaîne hydrocarbonée dont les signaux CH₂ viendraient se confondre avec ceux des molécules composant la cuticule. L'expérience CP-MAS permet de voir les carbones qui présentent un couplage dipolaire avec les hydrogènes. Plus le groupement CH est mobile, plus le couplage dipolaire diminue, s'exprimant par une diminution de l'intensité du signal. Si la mobilité est forte, le signal peut disparaître comme dans le cas des liquides. Dans les analyses d'agave de la figure B-C, l'extraction des cires et par conséquent de la partie cristalline de la cuticule entraîne une forte augmentation du signal à 29 ppm. Dans le cutane isolé (Figure I-47, A), le signal à 32 ppm est presque inexistant. Il en est de même pour l'analyse de la cuticule de tomate et de la cutine isolée (Figure I-47, E-F). Lorsque de l'amétryne est sorbée dans les cuticules d'agave et de tomate, le signal à 29 ppm augmente tandis que le signal à 32 ppm reste constant (Figure I-47, C-D et F-G).

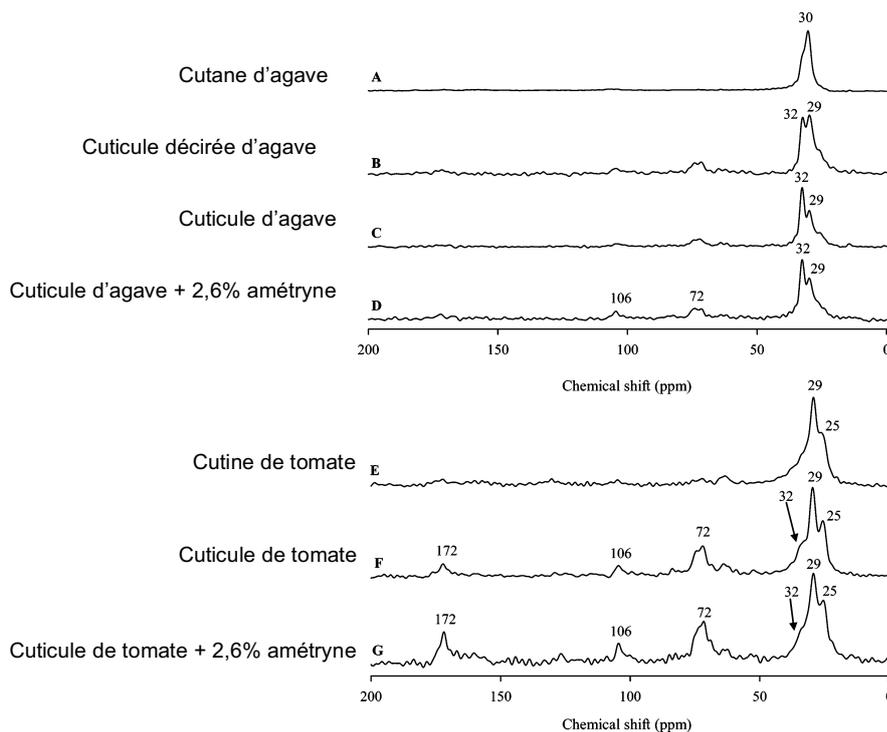
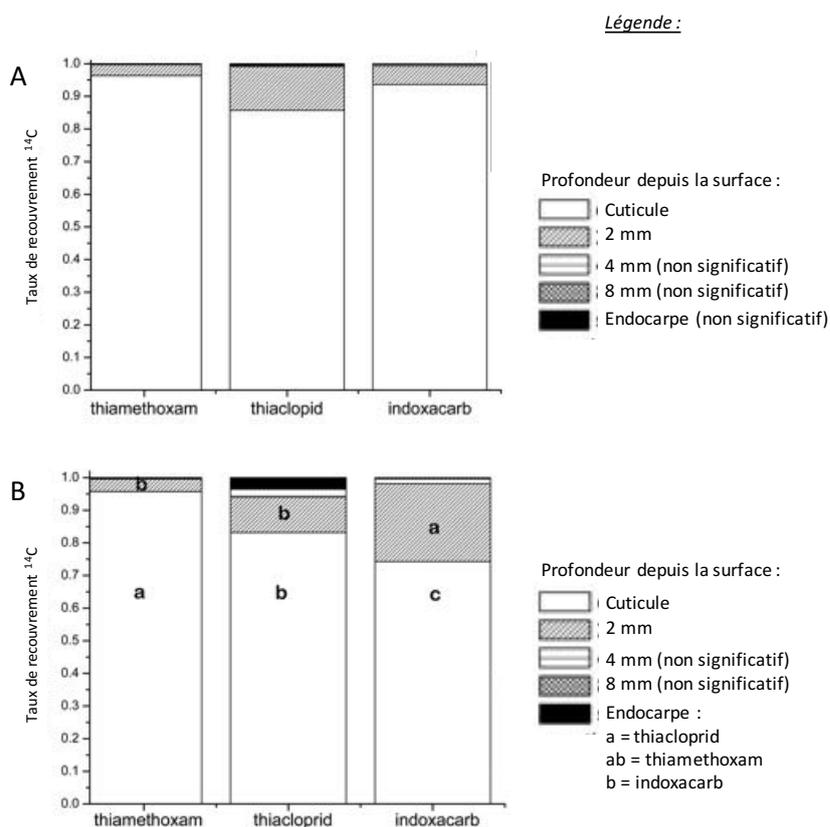


Figure I-47 : Spectres de RMN ¹³C par CP-MAS de différentes fractions de cuticules de feuilles de *Agave americana* et de cuticules de tomates avec et sans addition d'amétryne d'après Shechter *et al.* 2006 [112]

Il est conclu que la sorption de l'amétryne favoriserait une transition de phase physique dans la région paraffinique d'un état plutôt rigide vers un état plus mobile. La forte concentration en amétryne augmente la capacité de sorption des cuticules et facilite la désorption. Chen et Xing ont également démontré que la sorption d'hydrocarbures aromatiques polycycliques dans des cires cuticulaires reconstituées de grains de poivre vert entraînaient une augmentation du signal à 29 ppm ainsi que l'apparition d'un signal COOH à 167 ppm, ce qui impliquerait une transition d'une phase solide amorphe vers des phases mobiles amorphes (Chen *et al.* 2005 [111]).

En revanche, l'addition de charges solides et imperméables a pour effet de diminuer la diffusivité des espèces mobiles à travers la membrane cuticulaire en augmentant la longueur du chemin de diffusion. Ils agissent comme les cires cristallines. Ainsi, la suppression des cires cristallines et amorphes entraîne une diminution de la longueur du chemin de diffusion et réduit la viscosité, induisant une augmentation de la mobilité sans modifier la sélectivité de taille (Buchholz *et al.* 1998 [118], Buchholz 2006 [141]).

D'une manière générale, l'assimilation des pesticides augmente lorsque la concentration en tensioactifs augmente de 0,01 % à 1 %. Les tensioactifs sont ajoutés aux formulations aux concentrations idéales comprises entre 0,1 et 0,5 % (Wang et Liu 2007 [135]). En présence de tensioactifs, la concentration de la substance active joue un rôle fondamental pour que la pénétration soit optimale (Liu 2004 [152]). Deux variétés de pommes (Golden Delicious pour sa faible quantité de cires cuticulaires et Red Delicious pour sa quantité élevée de cires ont été traitées avec deux concentrations différentes, A (dose élevée) et B (dose faible), de phytosanitaires (Figure I-48) (Mota-Sanchez 2012 [146]).



NB la proportion moyenne des composés à l'intérieur d'un segment partageant la même lettre n'est pas significativement différente ($\alpha=0,05$)

Figure I-48 : Taux de recouvrement d'insecticides marqués au ^{14}C dans différents segments de pommes après 24 heures d'exposition, (A) pour un traitement à dose élevée, (B) pour un traitement à dose faible d'après Mota-Sanchez et al. 2012 [146]

Dans les deux cas, la majorité des résidus (74 %) sont localisés dans la cuticule. Le thiamethoxam et le thiacloprid se concentrent dans la cuticule et les 2 mm sous la cuticule quelle que soit la dose appliquée. En revanche, une plus grande proportion d'indoxacarb pénètre dans les 2 mm sous la cuticule dans le cas d'une dose plus faible d'exposition. Dans le cas de doses élevées (Figure I-48, A), la proportion de résidus au-delà de 4 mm sous la cuticule n'est pas significative. Par contre, pour des doses plus faibles (Figure I-48, B), des résidus ont pu être identifiés dans l'endocarpe des pommes (thiacloprid en particulier).

La manière dont agissent les tensioactifs dans la pénétration des pesticides a fait l'objet de nombreuses études ces trente dernières années. Les mécanismes sont complexes. Il semble qu'ils agissent à chaque étape du processus d'assimilation (Wang et Liu 2007 [135]) :

- en agissant sur les dépôts de pesticides à la surface des végétaux : ils doivent assurer un contact optimal entre les gouttelettes et la surface des végétaux (diminution des tensions de surface des formulations), empêcher ou retarder la formation des cristaux, retarder le séchage des gouttelettes grâce à un effet hygroscopique. Le glycérol a été utilisé comme humectant dès le début des années 50. Dans des régions à faible humidité, 0,5 % de glycérol augmente significativement le taux de pénétration du Dalapon. Rapidement ensuite, les humectants ont été utilisés avec succès dans des zones sèches et chaudes (Ramsey *et al.* 2007 [153]). La pénétration des dépôts amorphes ou sous forme de gel des herbicides est meilleure que celle de dépôts cristallins. Les formulations ont une meilleure efficacité lorsque les agents humectants sont associés à d'autres tensioactifs. En effet, les humectants seuls n'ont pas les propriétés tensioactives suffisantes pour une assimilation optimale tandis que les autres tensioactifs n'ont pas les propriétés pour maintenir l'hydratation des gouttelettes de pesticides. Cependant, lorsque l'eau contenue dans les gouttelettes sèche, les concentrations en humectants augmentent pouvant entraîner une précipitation des matières actives et donc une baisse de l'assimilation. Il est donc préférable que l'humectant (non ionique plutôt que sels hygroscopiques) présente des propriétés hygroscopiques.
- en agissant sur la diffusion transcuticulaire des pesticides : ils doivent augmenter la pénétration d'une part des composés hydrophiles en hydratant la cuticule et d'autre part des composés lipophiles en fluidifiant ou en réduisant la viscosité des cires cuticulaires.
- en agissant sur la perméabilité de la membrane plasmique.

b- Les huiles

Elles sont de deux natures : minérale d'origine pétrolière et végétale issue de graines. Les huiles végétales et leurs esters sont de plus en plus utilisés car plus écologiques et biodégradables. Elles sont utilisées comme émulsifiants à hauteur de 15 à 20 % dans les formules concentrées. Toutes les huiles pénètrent dans les végétaux. Elles peuvent optimiser l'efficacité de nombreuses classes d'herbicides : aryloxyphenoxy-propionates, cyclohexanediones, triazines, bentazone, phenoxy-acides, imidazolinones, sulfonylurées et phenmedipham (Wang et Liu 2007 [135]).

c- Les sels d'ammonium

Les sels d'ammonium sont utilisés depuis longtemps, le plus répandu étant le sulfate d'ammonium. Ils contribuent à optimiser la pénétration de nombreux pesticides bien que leurs effets dépendent de l'espèce végétale (Wang et Liu 2007 [135]).

3. 3. 4. Les conditions extérieures

La pénétration des molécules de phytosanitaires est enfin reliée aux conditions climatiques : température et humidité (Ramsey *et al.* 2005 [153]). Chaleur et humidité élevées consistent des conditions optimales de transfert des molécules actives. A l'image des accélérateurs actifs, une élévation de la température modifie la viscosité des cires en induisant le même effet plastifiant réversible sur les cires amorphes (Schreiber 2006 [150]). Par ailleurs, l'augmentation de la température diminue le facteur β' d'exclusion stérique de l'espèce végétale. Cela augmente ainsi la mobilité des solutés et donc le coefficient de diffusion (Cf. équations 6 et 7, Buchholz 2006 [141]).

Au-delà d'une certaine température, la pénétration est inhibée, en raison du séchage des gouttelettes de pesticides. A fortes températures, il faut une forte humidité pour empêcher la déshydratation des gouttelettes et favoriser ainsi la pénétration. L'humidité agit à la fois sur l'hydratation de la cuticule et des gouttelettes de phytosanitaires. Il a été montré que l'humidité était un paramètre plus important que la température pour la pénétration. Toutefois, l'importance de la température et de l'humidité est dépendant de l'espèce végétale. A la réflexion du nombre de combinaisons possibles pesticide-espèce-température-humidité, les mécanismes exacts à l'origine de l'influence des conditions climatiques sur l'assimilation des pesticides ne sont pas élucidés.

La sonication des membranes cellulaires entraîne une augmentation de la mobilité des solutés à 25°C d'un facteur 4 en diminuant l'énergie d'activation de diffusion (Buchholz 2006 [141]).

3. 4. Localisation des molécules dans le fruit

Liu en 2004 [158] observe l'état d'avancement de la pénétration de deux pesticides de polarités opposées à travers la cuticule des pommes au microscope laser confocal, vingt-quatre heures après contamination. Il conclue que les pesticides à caractère hydrophile ont peu d'affinité pour la cuticule lipophile, diffusant plus rapidement au travers afin de s'accumuler dans les premières cellules de l'épiderme (Figure I-49, A). Les pesticides lipophiles ont une plus grande affinité avec la cuticule et s'y accumulent plus longtemps, ralentissant ainsi la diffusion vers les cellules sous-jacentes de l'épiderme (Figure I-49, B).

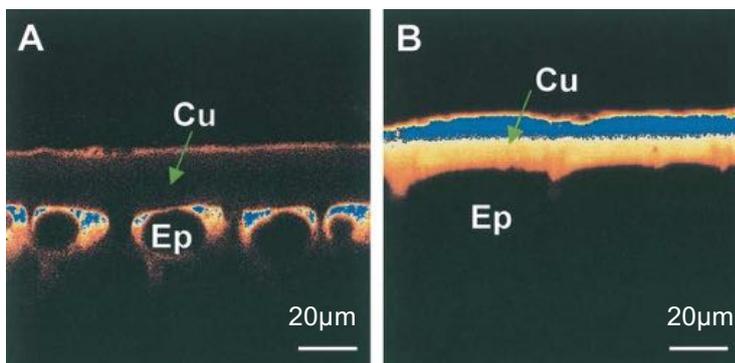
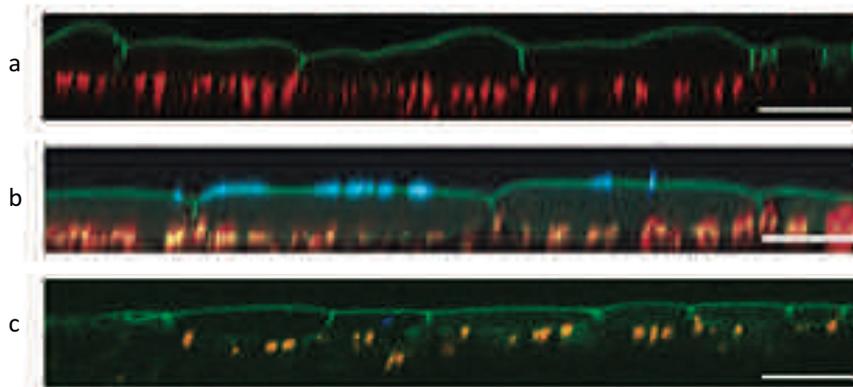


Figure I-49 : Observation au microscope laser confocal de la pénétration de deux pesticides (A) hydrophile et (B) lipophile à travers la cuticule d'une pomme d'après Liu 2006 [158]

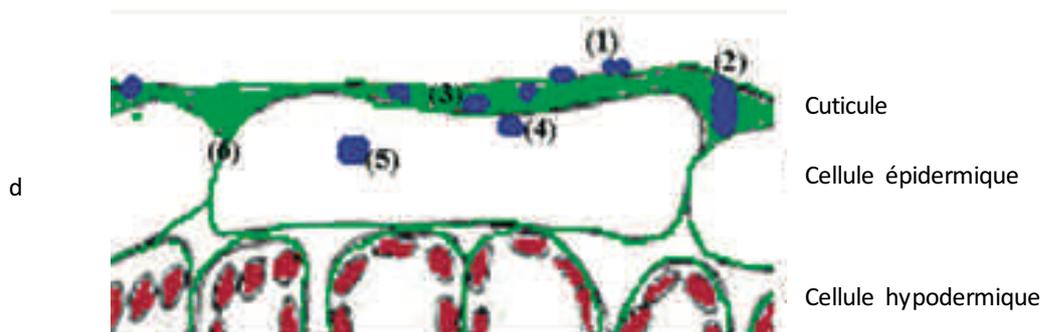
La microscopie biphotonique d'excitation (TPEM) a également été utilisée pour mettre en évidence la pénétration de polluants à la surface des végétaux (Wild *et al.* 2004 [147]). C'est une technique d'imagerie par fluorescence qui, associée à l'autofluorescence des tissus végétaux, a permis de visualiser les contaminants organiques *in vivo*, comme l'antracène dans les feuilles de maïs (Figure I-50). Le suivi de la contamination pendant 96 heures après l'application de l'antracène a conduit à la représentation schématisée de la pénétration du polluant dans l'épiderme de la feuille de maïs (Cf. § 3. 2.) (Figure I-50, d).

Légende :

Fluorescence verte = cuticule et parois cellulaires

Fluorescence rouge = chloroplastes

Fluorescence bleue = anthracène

Légende :

(1) Solubilisation dans les cires épicuticulaires

(2) Sorption et diffusion dans la cuticule

(3) Désorption sur les surfaces externes des parois cellulaires épidermiques

(4) Désorption sur les surfaces internes des parois cellulaires épidermiques

(5) Désorption dans le cytoplasme des cellules épidermiques

(6) Désorption dans les protrusions de la couche cuticulaire entre les cellules épidermique

Figure I-50 : Coupes transversales de feuilles de feuilles de *Zea mays* observées par microscopie biphotonique d'excitation (TPM), (a) avant contamination, (b) au moment de la contamination par l'anthracène, (c) 96 heures après contamination et représentation schématique de la pénétration de l'anthracène dans les feuilles de *Z. mays* d'après Wild et al. 2004 [147]

Dans les pommes, les molécules actives des PPT sont localisées jusqu'à plus de 90 % dans l'épiderme (Mota-Sanchez *et al.* [146], Rasmussen *et al.* 2003 [159]). Par exemple, le Chlorpyrifos-Me a été identifié majoritairement dans les cires épicuticulaires et dans l'épiderme des pommes (Figure I-51). L'étude de Riccio *et al.* en 2006 [160] montre également le rôle barrière des cires cuticulaires : la pomme décirée contient plus de résidus que la pomme originelle. Mais dans les deux cas, plus de 90 % des résidus de Chlorpyrifos-Me se concentrent dans la peau.

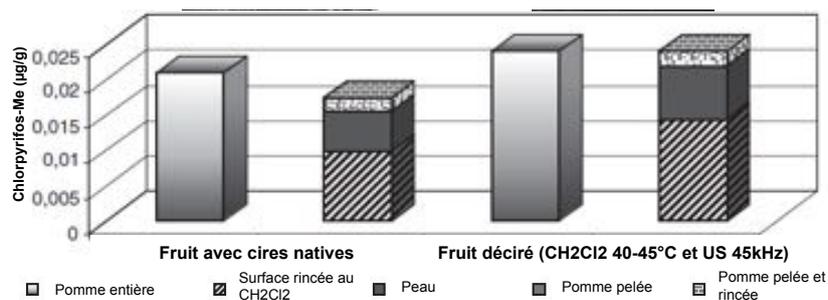


Figure I-51 : Localisation du chlorpyrifos-méthyl dans des pommes d'après Riccio *et al.* 2006 [160]

3. 5. Métabolisation des molécules de phytosanitaires dans la pomme

Une fois introduites dans le végétal, les molécules actives subissent des dégradations soit biotiques, induites par la matrice (dégradations chimiques, microbiennes, enzymatiques), soit relatives aux conditions abiotiques d'exposition des vergers ou de stockage après récolte par exemple (température, UV...) (Tableau I-21). Les études de dégradation des molécules actives dans le fruit permettent de déterminer le temps à partir duquel le fruit est consommable (temps entre la dernière application de PPT et la consommation) ainsi que la durée de protection du fruit contre les agresseurs. Les molécules peuvent être soit faiblement, soit fortement liées à la matrice. Par conséquent, les molécules en faible interaction subissent une dégradation à la fois induite par les facteurs abiotiques et biotiques tandis que celles en forte interaction sont seulement dégradées par les facteurs biotiques (Asensio *et al.* 1991 [161]).

La photodégradation est l'une des principales voies de métabolisation des molécules actives immédiatement après l'application des PPT dans les vergers (Lichiheb *et al.* 2015 [139]). Le rayonnement de longueur d'onde supérieure à 290-295 nm induit le processus aussi bien in situ dans le fruit que dans son environnement (eau, sols). La photodégradation dans le végétal a été peu étudiée. Elle peut être directe (la molécule absorbe la lumière directement), ou indirecte (la molécule réagit avec des radicaux issus d'un photo-inducteur). Il faut entre 70 et 120 kcal/mol d'énergie d'activation pour rompre les liaisons chimiques des molécules de phytosanitaires. Cela correspond à des longueurs d'onde comprises entre 250 et 400 nm. La photodégradation dans le végétal dépend de trois paramètres :

- la nature des molécules actives et la formulation,
- la nature de la matrice végétale (quantité et composition des cires cuticulaires, flore microbienne),
- les conditions climatiques d'exposition ou de stockage en post récolte (intensité et composition spectrale de la lumière, température, humidité).

Dans l'étude évoquée au paragraphe 3. 4., le chlorpyrifos-méthyl est photolysé dans les pommes et dans les pommes décirées. La photolyse est plus lente dans la pomme lorsque celle-ci contient encore ses cires (Riccio *et al.* 2006 [160]. En effet, les cires absorbent les UV (Buschhaus et Jetter 2011 [71,96], Solovchenko et Merzlyak 2003 [71,96]), protégeant ainsi les molécules de phytosanitaires. Mais, une fois pénétrées, les molécules sont métabolisées que dans l'épiderme (Clavijo *et al.* 1996 [162]).

L'évolution de la concentration des molécules actives à la surface du fruit suit le schéma général : pénétration – phase durant laquelle la concentration augmente – puis stabilisation – phase durant laquelle la concentration reste stable – et enfin dégradation – phase durant laquelle la concentration décroît lorsque la molécule est exposée aux agents chimiques et biologiques du fruit. Toutes les molécules ne réagissent pas forcément selon ce même schéma : la phase de stabilisation n'est pas automatique (Clavijo *et al.* 1996 [162]).

L'extraction des résidus pour analyse de même que la transformation des pommes par l'industrie agroalimentaire sont également responsables de la dégradation d'une partie ou de la totalité des molécules de phytosanitaires. Par exemple, le captane se métabolise en tétrahydrophthalimide (THPI) lorsque les pommes sont réduites en compotes (Kovakova *et al.* 2014 [163]).

Molécule active		Matrice	Références
Diazinon et chlorpyrifos		Pommes en laboratoire. Pommes en verger : dégradation plus rapide du diazinon, pas de différence pour le chlorpyrifos.	Asensio <i>et al.</i> 1991 [161]
Fénitrothion, dichlofluanid et malathion		Pommes en laboratoire : aucune dégradation du fénitrothion sur les 2 mois d'essai. Pommes en verger : les organophosphorés se dégradent plus vite en conditions climatiques réelles (UV, pluie, température).	Barrio <i>et al.</i> 1995 [164]
Organophosphorés : ethiofencarb, diclofuanid, fénitrothion, malathion		Epiderme des pommes : 17 ^e jour Réceptacle charnu : entre le 1 ^{er} et le 4 ^e jour	Clavijo <i>et al.</i> 1996 [162]
Organophosphorés : acéphate (métabolite = méthamidophos)		Surface externe de la pomme : dégradation immédiate et régulière. Epiderme : 12 ^e jour. Réceptacle charnu : 16 ^e jour.	Sanz-Asensio <i>et al.</i> 1999 [165]
21 PPT appliqués au verger		Pommes Melrose sous conditions climatiques monitorées de stockage (1-3°C) pendant 5 mois. Seulement 7 molécules détectées le jour de la récolte dont captane, cyprodinyl, dodine, pyrimethanil, tebuconazole, tolyfluanid et phosalone. Plus que 2 résidus après 5 mois de stockage : dodine et phosalone (traces).	Ticha <i>et al.</i> 2008 [166]

Tableau I-21 : Exemples d'études de dégradation des molécules de phytosanitaires dans les pommes

4. Réglementation sur l'usage des produits phytosanitaires et notion de résidus phytosanitaires

4. 1. La réglementation en France et en Europe

Initialement, en France, les premiers textes sur le droit des pesticides visaient à protéger l'agriculteur contre la fraude lorsqu'il achetait des PPT. Il faut attendre le RAP du 11 mai 1937 pour que l'utilisateur soit informé sur la nature des fongicides et herbicides commerciaux. La loi du 2 novembre 1943 introduit l'homologation des produits antiparasitaires à usage agricole.

A partir de 1976, le droit national des pesticides est remplacé par le droit européen. La Directive 76/895/CEE constitue le premier texte qui aborde concrètement la sécurité sanitaire. Elle définit les termes de résidus phytosanitaires et de mise en circulation des PPT (Cf. § 4. 2.).

A compter du 15 Juillet 1991, le droit national des pesticides est devenu indissociable du droit communautaire. Deux textes majeurs encadrent la réglementation des produits phytosanitaires : la Directive N°91/414/CE du 15 Juillet 1991, qui sera abrogée par la réglementation N°1107/2009/CE mise en application à compter du 14 Juin 2011. Dans ces textes, la mise sur le marché d'une formulation phytosanitaire se joue sur deux niveaux (EFSA [167]) : l'EFSA évalue les substances actives, tandis que les agences des états membres évaluent les demandes d'autorisations de mise sur le marché (AMM) selon une procédure uniformisée. Au terme d'une évaluation longue et inadaptée des substances actives, lancée par la Directive N°91/414, le nombre de substances autorisées est passé de 834, le 15 Juillet 1993, à 423 aujourd'hui. L'industrie a abandonné ainsi plus de 300 substances actives, pas toujours pour des problèmes liés à la toxicité mais souvent pour des raisons économiques. De nos jours, les textes évaluent la balance bénéfice/risque au profit de considérations sanitaires et environnementales. A compter du 14 Juin 2011, n'est approuvé qu'un produit phytosanitaire suffisamment efficace, dépourvu de tout effet nocif immédiat ou différé sur la santé humaine ou animale, n'ayant aucun effet inacceptable sur les végétaux, ne provoquant pas de souffrance inutile chez les vertébrés à combattre et n'ayant aucun effet inacceptable sur l'environnement.

Le Tableau I-22 résume les principales évolutions du droit des pesticides en France et en Europe (textes surlignés en gris) au XX^e siècle (Bonnefoy 2012 [37]).

Date	Evénement marquant
4 Février 1888	Loi sur les engrais : protéger les agriculteurs et viticulteurs contre les fraudes.
Entre 1903 et 1943,	le droit national des pesticides est régi par deux textes fondateurs :
4 Août 1903	Adaptation de la loi du 4 Février 1888 : les dispositions de la loi de 1888 sont appliquées aux préparations à base de cuivre. Cette loi visait à assurer à l'utilisateur des concentrations suffisantes en cuivre. Elle concerne les deux fongicides-herbicides préventifs « bouillie bordelaise » (mélange d'eau, de sulfate de cuivre et de chaux) et « bouillie bourguignonne » (sulfate de cuivre + bicarbonate de sodium), dont l'usage était très répandu en France vers le milieu des années 1880, en dehors des préparations naturelles.
18 Avril 1922	L'article 2 de cette loi renvoyait à un règlement d'administration publique (RAP) sur la sélection des méthodes analytiques pour la détermination du cuivre dans les préparations anticryptogamiques cupriques. Toutefois, ce texte d'application n'a jamais vu le jour.
10 Mars 1935	Textes législatifs qui modifient et complètent la loi du 4 Août 1903.
11 Mai 1937	Le RAP du 11 Mai 1937 impose, pour la première fois, un dispositif très complet qui vise à informer l'utilisateur sur la nature des fongicides et herbicides commerciaux. C'est l'un des plus long décrets à être resté en application jusqu'à son abrogation en 2012. Ce règlement introduit deux nouvelles notions : - l'efficacité des insecticides, anticryptogamiques et fongicides commerciaux, - référence à la loi du 19 Juillet 1845 sur les substances vénéneuses, complétée par trois lois promulguées entre 1916 et 1933.
La loi de 1903, les textes législatifs qui l'ont modifié et le RAP de 1937 sont les fondements des bonnes pratiques de laboratoire (BPL) et de l'étiquetage des produits phytosanitaires.	
2 Novembre 1943	Acte introduisant l'homologation : la loi N°525 régit le contrôle des produits antiparasitaires à usage agricole. Il s'agit d'imposer une homologation obligatoire des « antiseptiques et anticryptogamiques destinés à la protection des cultures et des matières végétales, les herbicides, les produits de défense contre les vertébrés et invertébrés nuisibles aux cultures et aux produits agricoles ainsi que les adjuvants » pour améliorer les conditions d'utilisation.
13 Avril 1945	L'ordonnance N°45-680 valide l'acte dit loi du 2 Novembre 1943 sur l'organisation du contrôle des produits phytosanitaires à usage agricole.
30 Juillet 1963	La loi N°63-762 actualise la loi du 2 Novembre 1943.
25 Novembre 1963	Le décret N°63-1183 actualise la loi du 2 Novembre 1943.
22 Décembre 1972	La loi N° 72-1139 étend le champ d'application de la loi validée et modifiée du 2 Novembre 1943 aux substances ou mélanges : - pour la défense des végétaux contre les attaques bactériennes ou virales, - tous les produits, autres que les engrais, destinés à exercer une action sur les végétaux et le sol, - les produits, autres que les médicaments, utilisant l'agriculture pour combattre les organismes animaux ou végétaux vecteurs de maladies humaines ou animales, - les produits destinés à l'assainissement et au traitement antiparasitaire des locaux, matériels, véhicules, emplacements et dépendances à l'usage des animaux domestiques, des récoltes, du transport ou de la transformation des produits d'origine animale ou végétale, de la collecte, du transport et du traitement des ordures ménagères et des déchets d'origine animale ou végétale (article 1 ^{er}).
1 ^{er} Août 1974	Le décret de 1974 perfectionne l'ensemble de la loi du 22 Décembre 1972. Il inclut une « commission d'étude de la toxicité des produits antiparasitaires à usage agricole et des produits assimilés » (article 2). C'est le premier texte qui traite de la sécurité des utilisateurs de pesticides. En 1974, la France dispose, grâce à ce décret, d'un dispositif institutionnel et juridique important.
En quête d'harmonisation,	les Etats membres de la communauté européenne souhaitent créer un véritable marché unique :
-	qui fixe les teneurs maximales admissibles en résidus phytosanitaires dans les denrées alimentaires (LMR),
-	qui interdit certaines substances actives,
-	qui laisse les Etats membres libres d'accorder les autorisations de mise sur le marché (AMM)
Fin 1978,	le premier cadre juridique commun est imposé par l'union européenne.

Tableau I-22 : Evolution de la réglementation en matière de phytosanitaires en France et en Europe au XX^e siècle (1/3) d'après Bonnefoy 2012 [37]

Date	Evénement marquant
23 Novembre 1976	La Directive 76/895/CE garantit la sécurité du grand marché intérieur des produits alimentaires, en limitant leurs teneurs maximales en résidus phytosanitaires admissibles. C'est le premier texte qui aborde la sécurité sanitaire. Elle définit les termes de « résidus de pesticides » et de « mise en circulation ». De ce fait, elle impose la circulation entre les 27 Etats membres de produits ayant un teneur en résidus de certains pesticides inférieure ou égale aux maxima fixés dans son annexe II, avec deux dérogations : - les Etats membres peuvent accepter des teneurs supérieures aux maxima à condition d'en justifier la raison, - ils peuvent interdire les produits pour lesquels ils jugent que les maxima présentent une menace envers la santé humaine ou animale. La Directive 76/895/CE organise également le contrôle des teneurs en résidus par les Etats membres et met en place une coopération étroite entre eux et la Commission du comité phytosanitaire permanent, instituée par la Directive 76/894/CE.
28 Décembre 1978	La Directive 79/117/CE interdit certaines substances actives dans le but de : - gérer la toxicité de certains produits vis-à-vis de la santé publique et/ou de l'environnement, - éviter la concurrence déloyale entre les pays ayant autorisé la substance et les autres l'ayant interdite.
15 Juillet 1991	Intégration du droit des pesticides dans le marché européen. La Directive 91/414/CEE prévoit que : - le choix des substances actives ne dépend plus de chaque Etat membre individuellement mais répond à une « liste positive » de substances autorisées par la communauté pour l'ensemble des territoires de ses Etats membres, - les Etats membres doivent introduire leurs demandes d'AMM auprès de leurs autorités compétentes (DGAL pour la France) et appliquer une procédure uniforme pour les instruire. Elle lance une opération massive d'évaluation des substances actives existantes sur le marché et concrètement intégrables dans sa « liste positive ». Le programme de travail est établi sur 12 ans jusqu'en Juillet 2003.
22 Septembre 1994	La Directive 97/57/CE établit les principes de la procédure d'évaluation et d'autorisation des produits phytosanitaires, parmi les plus innovants : - évaluer les informations relatives à l'efficacité du produit, à l'absence d'effet inacceptables sur les végétaux et à l'incidence sur la santé humaine, - reconnaissance mutuelle des AMM au niveau de l'Union Européenne.
25 Juillet 2001	La Commission européenne présente un rapport sur l'état d'avancement du programme de travail sur l'évaluation des substances actives de la Directive 91/414. Elle demande un report d'échéance de 2003 à 2008.
31 Mai 2002	Le Parlement européen vote la motion : - fustigeant le rythme du travail (seules 31 substances sur 834 ont été complètement évaluées 10 ans après l'adoption de la Directive 91/414), les incohérences (évaluations inutiles de substances dont la toxicité était avérée, « flexibilité excessive introduite dans la procédure d'évaluation des substances actives de la première liste » par manque de critères clairs et des lacunes dans l'évaluation qui a négligé les perturbateurs endocriniens, les adjuvants synergistes et les effets cocktails de plusieurs pesticides). Le Parlement déplore qu'aucune décision de non inscription à la « liste positive » n'a été motivée par des raisons liées à la santé humaine : l'inscription à l'annexe I de la Directive 91/414 ne constitue pas un gage d'innocuité. - souhaitant réformer en profondeur la procédure d'AMM, - approuvant 2 modifications proposées par la Commission dans son état d'avancement du 25 Juillet 2001 (évaluation comparative des substances actives et intérêt pour la résistance aux produits phytosanitaires, pour la lutte intégrée contre les nuisibles des végétaux et pour les pratiques agricoles de substitution), - invitant la Commission à réviser ses méthodes de travail (la révision devant être présentée avant fin 2002). Les Députés ont demandé la création rapide d'une banque de données communautaires relatives à la production et à la vente de tous les pesticides, à leur mode d'utilisation par culture, tout en précisant les propriétés toxicologiques et les solutions non chimiques disponibles.
29 Avril 2004	Le règlement N°850/2004 du Parlement européen et du Conseil intègre une dernière modification à l'annexe de la Directive 79/117/CE, concernant les polluants organiques persistants.
23 Février 2005	Le règlement du Parlement européen et du Conseil abroge la Directive 76/895/CE afin d'uniformiser définitivement et totalement les limites maximales applicables aux résidus de pesticides présents dans les produits d'origine animale et végétale admises sur le territoire des Etats membres.
21 Octobre 2009	La Directive N°2009/128/CE instaure un cadre d'action communautaire pour une utilisation des pesticides compatibles avec le développement durable. Elle aura comme répercussion au niveau national la mise en place d'une série de lois, ordonnances, arrêtés et décrets entre 2009 et 2011
28 Octobre 2008	Décret N°2009-1319 (en réponse à la Directive N°2009/128/CEE) : programme national de réduction des pesticides.

Tableau I-22 : Evolution de la réglementation en matière de phytosanitaires en France et en Europe au XX^e siècle (2/3)
d'après Bonnefoy 2012 [37]

Date	Evénement marquant
29 Octobre 2009	Un important dispositif juridique voit le jour : - le règlement du Parlement européen et du Conseil N°1107/2009 abroge la Directive 79/117/CE et institue un nouveau système d'évaluation des produits phytosanitaires et une nouvelle procédure d'AMM, - une directive vise à réduire le recours aux produits phytosanitaires, - une directive vise le matériel d'épandage, - un règlement concerne les statistiques.
27 Juillet 2010	Loi française 2010-874 (en réponse à la Directive N°2009/128/CEE) : modernisation de l'agriculture et de la pêche
31 Mai 2011	Arrêté (en réponse à la Directive N°2009/128/CEE) sur les conditions d'épandage par voie aérienne des produits mentionnés à l'article L.253-1 du code rural et de la pêche maritime.
11 Juin 2011	L'ensemble du dispositif du 29 Octobre 2009 (règlements d'application ou d'exécution) est publié au Journal Officiel de l'Union Européenne. Il sera mis en application 3 jours plus tard.
14 Juin 2011	La Directive 91/414 est abrogée. Toutefois, les AMM conclues avant 2011 sur ce dispositif réglementaire ne seront caduques qu'en 2021 (durée AMM = 10 ans). Entrée en vigueur du règlement N°1107/2009. L'évaluation des substances actives reste imputée aux structures communautaires tandis que les délivrances des AMM sont toujours dévolues aux Etats membres. Le texte communautaire inclut en plus des substances actives les adjuvants des préparations phytosanitaires : synergistes et phytoprotecteurs. Les co-formulants peuvent être inscrits dans une sorte de liste négative s'ils sont déclarés « inacceptables ».
27 Juin 2011	Au niveau communautaire, l'évaluation des substances actives n'a pas été pertinente. La Directive 91/414 a éliminé une grande majorité de substances actives dangereuses pour la santé humaine sur la base de la toxicologie classique liée à la dose journalière admissible (DJA). Toutefois, la procédure très lourde et coûteuse d'évaluation des substances actives a découragé le maintien sur le marché de substances utiles, peu nocives mais aux débouchés étroits au profit de produits dangereux mais plus rentables. Dans un avis du 19 Février 2012, la commission de l'agriculture et du développement rural du Parlement européen observe que, pour de très nombreuses substances, il n'existe pas de seuil de sécurité et que l'éventualité d'une perturbation endocrinienne n'est pas prise en compte. L'évaluation des substances actives n'inclut pas non plus l'effet éventuellement toxique du mélange composant la formulation phytosanitaire.
15 Juillet 2011	Arrêté (en réponse à la Directive N°2009/128/CEE) sur l'interdiction d'utilisation de certains produits mentionnés à l'article L.253-1 du code rural et de la pêche maritime. Sur le plan national, la procédure d'AMM a fait l'objet d'une mauvaise application du droit des pesticides, à commencer par la non application du quotient de danger (DL 50 sur les abeilles) et la réduction à partir de 2008 de la durée des AMM à 1 an.
3 Octobre 2011	Ordonnance (en réponse à la Directive N°2009/128/CEE) pour la mise en conformité des dispositions nationales avec le droit de l'Union européenne Le Conseil d'Etat français rend un arrêt concernant la durée des AMM (non dérogeable à la durée de 10 ans prévue par l'article R253-38 du code rural) et les conditions de l'instruction par le ministre des demandes d'AMM.
18 Octobre 2011	Le décret N°2011-1325 (en réponse à la Directive N°2009/128/CEE) fixe les conditions de délivrance, de renouvellement, de suspension et de retrait des agréments des entreprises et du certificat individuel pour la mise en vente, la distribution à titre gratuit, l'application et le conseil à l'utilisation des produits phytosanitaires.
21 Octobre 2011	Cinq arrêtés instruisant la formation dont le principe figure dans la Directive N°2009/128/CEE.
9 Novembre 2011	Le décret N°2011-1480 remplace la Directive 2006/42/CE par la Directive 2009/127/CE afin d'y introduire le matériel d'épandage. Le texte institue une AMM pour un appareil de pulvérisation neuf ainsi que deux normes permettant de délivrer le marquage CE et un certificat de conformité. Les nouvelles obligations de la Directive 2009/127/CE figurent dans la norme EN 12761 : 2000, au niveau des généralités, des pulvérisateurs pour cultures basses et des pulvérisateurs à jets portés pour les arbustes et arboricultures.
9 Mai 2012	Depuis le 15 Décembre 2011, ces exigences sont applicables aux pulvérisateurs vendus neufs
1 ^{er} Juillet 2012	Décret assurant la mise en conformité des dispositions nationales avec le règlement N°1107/2009.
31 Décembre 2016	Abrogation du décret du 11 Mai 1937 par l'article 5 du décret N°2012-755 du 9 Mai 2012. Premier rapport de la Commission sur les statistiques des pesticides relatif au règlement N°1185-2009.

Tableau I-22 : Evolution de la réglementation en matière de phytosanitaires en France et en Europe au XX^e siècle (3/3)
d'après Bonnefoy 2012 [37]

4. 2. Définition et encadrement légal des résidus phytosanitaires

Environ 4000 produits bénéficient d'une autorisation de mise sur le marché en France (Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt [168]). La France est le premier Etat membre consommateur en terme de tonnage avec plus de 60000 T utilisés en 2011 (surface agricole > moitié du territoire) et le 7^e en terme de quantité de produits en kg utilisé à l'hectare. Notons que la vente de substances actives a diminué de 40 % entre 1999 et 2006. Cette baisse régulière peut s'expliquer par la prise en compte des effets toxiques des produits, ainsi que par le développement de formulations efficaces à très faible dose (moins de produits car plus d'efficacité).

La Direction Générale de l'Alimentation (DGAL) décide des autorisations de mise sur le marché (AMM), des modifications des AMM et des retraits. Il y a en moyenne 2000 décisions par an. Les AMM ne sont délivrées qu'après validation de l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES).

Le résidu phytosanitaire désigne toute substance ou mélange de substances contenues dans les denrées destinées à l'alimentation humaine et animale, résultant de l'usage de PPT et incluant les produits dérivés tels que les produits de dégradation et de conversion, les métabolites, les produits secondaires réactionnels et les impuretés présentant un seuil significatif de toxicité (Nic *et al.* 2009 [169]).

Les limites maximales de résidus (LMR) des produits phytosanitaires applicables pour l'alimentation humaine et animale sont régies par le règlement N°396/2005/CE adopté par le Parlement Européen et le Conseil le 23 février 2005 (application au 1^{er} septembre 2008) et par quatre directives du Conseil (ORP [170]) :

- la directive 76/895/CEE concernant la fixation des teneurs maximales pour les résidus de pesticides sur et dans les fruits et légumes,
- la directive 86/362/CEE concernant la fixation des teneurs maximales pour les résidus de pesticides sur et dans les céréales,
- la directive 86/363/CEE concernant la fixation des teneurs maximales pour les résidus de pesticides sur ou dans les produits d'origine animale) et
- la directive 90/642/CE concernant la fixation des teneurs maximales pour les résidus de pesticides sur ou dans certains produits d'origine végétale, y compris les fruits et légumes.

Le règlement N°396/2005/CE prévoit la réalisation d'un programme communautaire (Autorité Européenne de Sécurité des Aliments) et de programmes nationaux de contrôle, avec deux objectifs : contrôler le respect de la législation en vigueur et estimer le niveau d'exposition des consommateurs. Les programmes nationaux doivent rechercher les résidus de produits phytosanitaires dans les fruits et légumes, les céréales, le *baby-food*, les produits d'origine animale ainsi dont les produits de la mer et d'eau douce. L'ANSES, *via* l'Observatoire des résidus de pesticides évalue les risques de l'exposition alimentaire liée aux résidus phytosanitaires et produit des indicateurs alimentaires dont l'indicateur d'exposition alimentaire (Ecophyto). Pour chaque résidu, l'ANSES évalue l'exposition et le risque chronique ; Il reste à déplorer que ne sont pas pris en compte les voies autres qu'alimentaire de contamination (voies respiratoire et cutanée qui toucheraient professionnels agricoles, employés municipaux... et particuliers – jardiniers amateurs, entretien ménager...). Dans ce cadre, l'ANSES a réalisé, entre 2010 et 2011 l'analyse de 142 échantillons de denrées végétales, 26 échantillons de denrées animales et un échantillon d'eau potable (ANSES 2014 [171]). Parmi les 524 molécules

actives recherchées, seulement 226 sont issues de la « liste positive » du règlement N°1107/2009/CE, 224 ne sont plus approuvées, 3 sont en cours d'évaluation et 71 sont considérées comme autres métabolites, produits de dégradation et biocides.

Le dernier rapport annuel de l'EFSA en 2012 [172] relatif à la surveillance à l'échelle européenne des résidus phytosanitaires dans les denrées alimentaires a conclu que 97,1 % des échantillons analysés contenaient des résidus inférieurs aux LMR fixées par l'UE. 54 % ne présentaient aucune trace détectable et seulement 3 % présentaient des dépassements de LMR (brocolis 2,8 % de dépassements, les choux-fleurs 2,1 %, le raisin de table 1,8 %, les poivrons 1,4 % et les aubergines 1 %, les bananes et le blé 0,7 %, les petits pois et l'huile d'olive 0,1 %).

Les LMR correspondent à des couples « matière active – denrée alimentaire » et sont établies à partir des données toxicologiques et agronomiques (Cf. LMR phytosanitaires-pomme dans Tableau I-10). Elles sont conformes aux bonnes pratiques agricoles des Etats membres et des pays tiers *i.e.* l'utilisation avisée de quantités minimales suffisantes et nécessaires pour protéger efficacement les cultures tout en aboutissant à des niveaux de résidus acceptables *i.e.* sans effet sur la santé. Elles sont toujours définies après une évaluation approfondie des risques potentiels encourus par les consommateurs, sans représenter pour autant des limites toxicologiques mais leur dépassement est le signe d'une utilisation incorrecte d'un PPT. Chaque dépassement alerte les autorités des Etats membres (surveillance, évaluation et notification).

La Direction générale de la santé et des consommateurs DG Sanco est un service administratif de la Commission européenne. La DG Sanco a pour mission de proposer les mises à jour (nouvelles législations) et de veiller au respect de la législation européenne en vigueur en matière de sécurité des denrées alimentaires, de droits des consommateurs et de protection de la santé humaine pour l'Union européenne.

Notons enfin que certains pesticides sont classés parmi les polluants organiques persistants (POP). Les POP sont des composés organiques dont la persistance dans l'environnement (résistance aux processus chimiques, biologiques et photolytiques de dégradation) engendre une bioaccumulation importante avec des impacts négatifs sur la santé humaine et animale et l'environnement. Deux textes ont pour objectifs de contrôler, réduire ou éliminer les émissions dans l'environnement des substances reconnues officiellement comme POP : le Protocole d'Aarhus et la Convention de Stockholm (Ministère de l'Ecologie, de Développement Durable et de l'Energie 2015 [173]). Le Protocole d'Aarhus a été signé en Juin 1998, lors de la Convention de Genève sur la pollution atmosphérique transfrontalière longue distance, sous l'égide de la Commission économique des Nations unies pour l'Europe (CEE-NU). Il est ratifié en France en 2003. La Convention de Stockholm a été signée en mai 2001 dans le cadre du programme des Nations unies pour l'environnement (PNUE). Elle a été ratifiée en France en 2004. Dans l'Union Européenne, c'est le Règlement CE n° 850/2004 (ou règlement POP) qui met en œuvre les accords internationaux qui encadrent les POP (Wodli 2015 [174]). Dans l'annexe I, de nombreux insecticides organochlorés sont reconnus comme POP et inscrits dans la liste de la Convention de Stockholm : chlordane, dieldrine, heptachlor, toxaphène, DDT, chlordécone, lindane...

5. Les techniques d'analyses des résidus

Les méthodes d'analyse des résidus à mettre en œuvre pour le contrôle sanitaire imposé par l'Etat sont fixées par différents arrêtés (Bonneyoy 2012 [37], LNE 2008 [39]). Elles sont complexes car elles sont le reflet :

- de la diversité des classes chimiques couvertes par l'ensemble des produits phytosanitaires,
- de la diversité des matrices (eaux, denrées alimentaires, sols, sédiments, végétaux...) engendrant des interférences variées,
- des limites de détection d'autant plus basses que les niveaux de sécurité s'élèvent (diminutions régulières des LMR).

Les échantillons doivent être traités avec précaution afin que les taux de résidus mesurés soient représentatifs de la contamination. Ils doivent être préparés dans les plus brefs délais puis congelés et protégés de la lumière afin de limiter les dégradations des molécules de phytosanitaires *in situ* (Cf. § 3. 5.) (Commission Européenne 1997 [175]).

Les méthodes analytiques sont développées et validées afin d'identifier et de quantifier les molécules actives dans les différentes matrices contaminées à des niveaux de concentration différents. Il n'existe actuellement aucun système capable d'analyser directement les résidus. La préparation d'un échantillon pour analyse consiste en deux étapes (*i*) l'extraction des résidus depuis la matrice et (*ii*) la purification de l'extrait avant analyse. L'analyse identifie et quantifie les molécules actives. Aucune méthode analytique actuelle ne peut identifier et quantifier l'ensemble des molécules actives en une seule et même procédure. Toutefois, ces dix dernières années, grâce à l'utilisation de la spectrométrie de masse, des méthodes dites « multirésidus » permettent de doser plus de 100 composés en une seule injection chromatographique.

5. 1. Les méthodes d'échantillonnage (extraction / purification)

De nombreuses méthodes ont été répertoriées pour isoler et enrichir les résidus phytosanitaires à partir de matrices alimentaires à des fins d'analyse. Elles peuvent être classées en deux grandes catégories (Sobhandazeh *et al.* 2014 [176]) : les méthodes d'extraction et/ou purification par solvants et sur supports solides.

5. 1. 1. Extractions par solvants

Les extractions par solvants sont des extractions solide-liquide ou liquide-liquide selon l'état physique de la matrice (solide ou liquide). Dans le cas des matrices alimentaires solides (fruits, légumes, produits transformés), les échantillons sont préalablement réduits en purée la plupart du temps sous azote liquide. Ils doivent être les plus homogènes possibles pour être représentatifs.

La polarité des solvants d'extraction doit être adaptée en fonction des types d'analytes d'intérêt qu'il faut extraire pour les analyser, tout en limitant la co-extraction d'analytes de la matrice. Les solvants les plus communément utilisés sont (Fenik *et al.* 2011 [177]) :

- acétate d'éthyle (extraction des pesticides dans les légumes verts, extraction des fongicides, acaricides et insecticides dans les oranges...),

- acétone (extraction des organochlorés dans les matrices fruits, légumes et tubercules, extraction des organophosphorés dans les pommes, leurs jus, les tomates, plus généralement pour l'extraction des pesticides dans les fruits et légumes frais...),
- acétonitrile (extraction des organochlorés, organophosphorés et fongicides dans les carottes et les oranges...),
- méthanol (extraction des insecticides organochlorés, organophosphorés et pyréthriinoïdes, des fongicides, acaricides et herbicides dans les dattes, plus généralement extractions des résidus dans les fruits et légumes...),
- dichlorométhane,
- n-hexane (extraction des organochlorés dans les fruits, les légumes et les tubercules...),
- éther diéthylique...

Des mélanges peuvent aussi être utilisés avec succès :

- acétate d'éthyle/cyclohexane (1 :1) (extraction des résidus dans les matrices riches en lipides telles que les avocats, extraction des pesticides dans les fruits et légumes frais...),
- chloroforme/méthanol,
- dichlorométhane/méthanol...

Il existe plusieurs méthodes pour extraire les résidus des matrices (Sobhandazeh *et al.* 2014 [176], Fenik *et al.* 2011 [177], Wilkowska et Biziuk 2011 [178]) :

- *L'extraction par solvants solide-liquide (ESL) et liquide liquide (ELL)*

L'acétonitrile associée à différents volumes d'eau dans le cas de matrices sèches (céréales, aliments secs pour bétail, fourrages) a été utilisée dès les années 60 pour extraire les insecticides organochlorés et autres pesticides apolaires dans les denrées alimentaires à faible teneur en lipides (méthode de Mills). L'extraction est suivie d'une séparation par solvants apolaires (éther de pétrole + NaCl, dichlorométhane, dichlorométhane + hexane), au cours de laquelle les insecticides organophosphorés sont en partie perdus. En 1971, la méthode est modifiée de façon à permettre l'extraction d'analytes de différentes polarités (méthode de Storherr).

Dans les années 70, l'acétone remplace l'acétonitrile. Elle est suivie d'une ELL par solvants apolaires (dichlorométhane, dichlorométhane + éther de pétrole) ; Elle permet d'extraire une large gamme de pesticides de différentes polarités (organochlorés, organophosphorés et organoazotés). Le chlorure de sodium NaCl est ajouté pour la première fois dans la phase d'extraction. En 1987, De Kok a développé une méthode d'extraction de résidus de phytosanitaires dans les matrices alimentaires (céréales, fruits et légumes) par homogénéisation à l'ultraturax des échantillons successivement dans l'acétone, puis dans le dichlorométhane et l'éther de pétrole (De Kok *et al.* 1987 [179]). Les extraits obtenus dans le mélange de solvants sont généralement très riches en analytes matrices et nécessitent une phase de purification (colonne de silice greffée aminopropyle).

Peu à peu, les solvants chlorés sont remplacés (mélanges cyclohexane/acétate d'éthyle 1 :1, dichlorométhane/éther de pétrole 1 :1). En 1996, la SPE est introduite pour purifier les extraits dans l'acétone. La méthode de Mills est modifiée : l'extraction par l'acétonitrile est suivie de l'ajout de sels ($MgSO_4$ et/ou NaCl) à la place de l'utilisation des solvants apolaires, pour séparer la phase aqueuse de l'acétone. La phase organique est ensuite purifiée par une extraction sur phase solide inverse (RP-SPE). Par l'utilisation de l'acétate d'éthyle, non miscible avec l'eau, l'ajout de sels pour séparer la

phase aqueuse de la phase organique devient superflu. Cependant, certains pesticides parmi les plus polaires ne sont pas extraits par l'acétate d'éthyle. L'addition d'importantes quantités de sulfate de sodium Na_2SO_4 , en saturant l'eau, ont permis d'augmenter les taux de recouvrement des analytes polaires. Des solvants plus polaires comme le méthanol ou l'éthanol sont mélangés à l'acétate pour augmenter la polarité de la phase organique.

En parallèle, le développement d'une chimie analytique verte dans les années 90 fait émerger de nouvelles techniques d'extraction peu consommatrices en solvant : MAE, SFE, ASE...

- *L'extraction par Soxhlet*

La technique est simple à mettre en œuvre mais elle présente de nombreux inconvénients : un seul échantillon est traité, le volume de solvant est important, la durée d'extraction est élevée, les analytes ne doivent pas être sensibles à la chaleur (température d'ébullition du solvant d'extraction à pression atmosphérique). Le Soxtec est une technique améliorée du Soxhlet. L'appareil permet de traiter plusieurs échantillons à la fois. Les taux de recouvrement sont meilleurs et la durée d'extraction est plus courte. Mais l'investissement est important. Elle peut être assistée par microondes.

- *L'extraction par solvant sous pression (ASE)*

L'ASE est une technique d'extraction accélérée par solvant (Accelerated Solvent Extraction), totalement automatisée et munie de passeur d'échantillons qui permet de traiter de nombreux échantillons à la suite. L'échantillon broyé et de granulométrie maîtrisée est mélangé à une matrice inerte (sable, Hydromatrix, Celite 545, diatomées...) qui sert également d'adsorbant de purification, pour être introduit dans une cellule en acier inoxydable. La cellule est extraite par du solvant à chaud entre 40 et 200°C sous pression. Les durées d'extraction sont généralement courtes et les volumes de solvants utilisés faibles. Il est possible de procéder à des extractions séquencées en utilisant différents solvants successivement. Le coût d'investissement est élevé. L'ASE peut être utilisée pour extraire les pesticides mais il est quand même nécessaire de coupler une phase de purification à la suite.

De nombreux travaux ont mis en œuvre l'ASE pour l'extraction de pesticides avec de très bons taux de recouvrement : dans les céréales (60-120 % pour 382 sur 405 pesticides) (Pang *et al.* 2006 [180]), dans les fruits (> 70 % pour 24 sur 28 pesticides (Adou *et al.* 2001 [181]), 77-99 % pour 10 pesticides dans les oranges et les pêches (Blasco *et al.* 2005 [182]), dans les légumes (71-103 % - acétate d'éthyle - pour 6 insecticides, un herbicide et un fongicide dans des légumes verts) (Tanaka *et al.* 2007 [183]) et la nourriture en général (63-128 % en moyenne pour 26 pesticides dans les purées de pommes, 82-125 % dans des purées de carottes (Richter *et al.* 2001 [184]), 93-108,6 % pour 12 pesticides organochlorés dans la banane (Ezzell 2000 [185]). Mais la sélectivité est faible. Dans cette technique, la température doit être maîtrisée afin de ne pas entraîner de thermolyse des pesticides.

- *L'extraction assistée par microondes (MAE)*

L'extraction assistée par microondes est également une méthode d'extraction accélérée des résidus, basée sur des températures et des pressions élevées. Les échantillons et les solvants d'extraction

sont placés dans des cellules hermétiques. Les cellules sont chauffées dans un four à microondes et se mettent sous pression lorsque la température d'ébullition du solvant est dépassée. Généralement, les durées d'extraction sont très courtes et la quantité de solvant utilisée pour l'extraction est faible. Plusieurs échantillons peuvent être traités à la fois. Après refroidissement des cellules, il faut récupérer l'extrait en le séparant du résidu d'extraction et le purifier. Les analytes d'intérêt doivent être stables à la température. Elle peut être utilisée pour extraire des herbicides dans les sols et des hydrocarbures polycycliques aromatiques dans les sédiments. Cependant, la sélectivité est faible.

- *L'extraction assistée par ultrasons (UE)*

L'usage des ultrasons lors des étapes d'extraction par solvants permet généralement d'améliorer les taux de recouvrement des pesticides.

- *L'extraction par fluide supercritique (SFE) (Lehotay 1997 [186])*

C'est une technique présentant un coût d'investissement et de maintenance du matériel important mais les durées d'extraction et les volumes de solvants sont très réduits. La SFE utilise dans la plupart des cas le CO₂ supercritique pour extraire les analytes d'intérêt qui est cependant inefficace pour l'extraction des herbicides, sauf si les herbicides sont finalement recueillis dans le résidu plutôt que dans l'extrait qui s'est enrichi en analytes matrice. En ajoutant des adsorbants (Celite, Extrelut, Hydromatrix, Florisil, aminopropyle), il est possible d'accomplir en une seule tâche l'extraction et la purification. La technique n'entraîne pas une dégradation des analytes d'intérêt. Toutefois, les résultats ne sont pas probants (faible sélectivité, co-extraction des lipides, extraction difficile des analytes thermolabiles et des composés plutôt polaires contenant des fonctions amine, amide et imine, et des structures similaires pouvant se charger facilement).

- *L'extraction sur membranes polymériques (LPME) (Lambropoulou et Albanis 2007 [187])*

Le principe consiste en une introduction directe des échantillons, parfois issus de matrices très complexes (eaux, jus de fruits, vins, boues, sols, sédiments, lait, fruits et légumes...). Les volumes mis en jeu sont très faibles : quelques millilitres pour l'échantillon et quelques microlitres pour le solvant d'extraction (n-hexane, 1-octanol, tétrachlorure de carbone, chlorobenzène, éther n-hexylique, éther, undécane, éther dihexylique, 1-chlorobutane et cyclohexane). La technique peut être automatisable. Les analytes interférents sont correctement éliminés et l'enrichissement en analytes d'intérêt est très élevé, ce qui lui confère une sélectivité importante. Elle requiert une étape préalable d'optimisation très importante. Mais l'efficacité est relativement faible notamment parce que les particules solides peuvent obturer les pores des membranes. Généralement, les durées d'extraction sont très longues.

5. 1. 2. Extractions et/ou purifications sur supports solides

Les techniques les plus courantes de sorption sur supports solides (Figure I-52) utilisées pour la purification des extraits obtenus à partir des denrées alimentaires telles que les fruits et légumes, ou bien pour l'extraction des analytes d'intérêts dans des échantillons liquides tels que les eaux sont les suivantes (Fenik *et al.* 2011 [177]) :

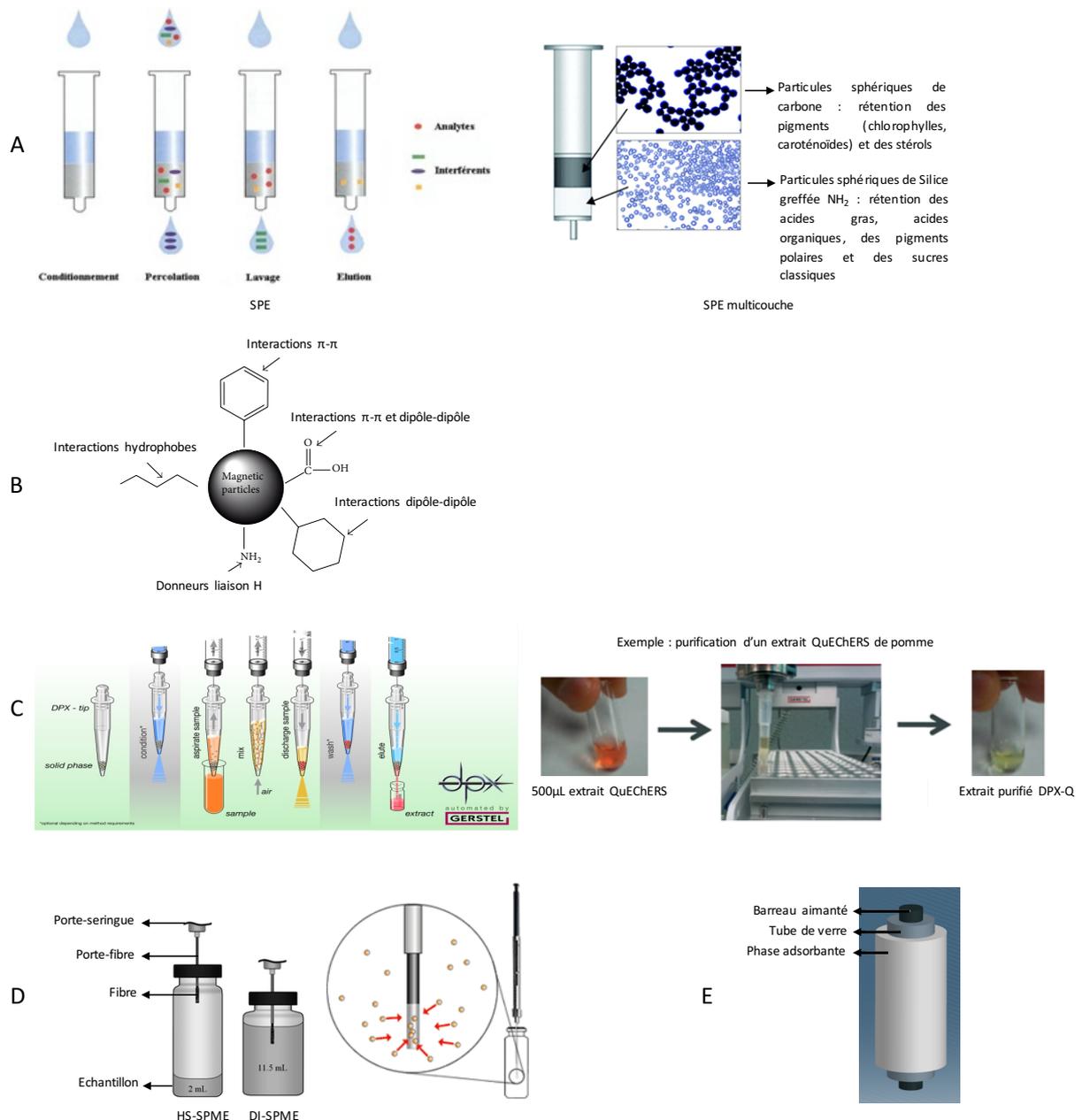


Figure I-52 : Différentes techniques d'extraction-purification sur supports solides : (A) SPE, (B) interactions impliquées en MSPE d'après Ibarra et al. 2015 [188], (C) DPX, (D) SPME, (E) SDBS

- L'extraction sur phase solide (SPE)

La SPE est la technique la plus répandue de purification des extraits avant analyse. C'est la méthode de référence pour l'analyse des pesticides dans les échantillons d'eau (Villaverde et al. 2016 [189]). Elle repose sur la séparation des analytes matrices et des analytes d'intérêt entre le solvant d'élution et le support adsorbant (Figure I-52, A). De nombreux supports existent et couvrent une large gamme de polarité, d'hydrophobicité ou d'ionisation. Les phases les plus courantes pour le traitement des matrices fruits et légumes sont des phases en mode normal du type échangeuses d'anions faibles (amines primaires secondaires PSA, aminopropyl NH_2 , diéthylaminopropyl DEA), souvent couplées avec des phases échangeuses d'anions forts (SAX, QMA) (Biziuk et Stocka 2015

[190]). D'autres phases sont également proposées : Florisil, RP-C18, alumine, silicate de magnésium, carbone graphitisé (GCB), OASIS HLB (Waters)...

La SPE multicouche est une méthode de purification de l'extrait de pesticides (Figure I-52, A). Pendant l'élution de l'extrait, les différents composants de la matrice sont piégés sur les différentes couches d'adsorbants (PSA, NH₂, noir de graphite) tandis que les pesticides non retenus passent dans l'éluat. Les volumes requis par la procédure sont plus importants (de l'ordre de 50 mL) que pour la SPE et les extraits doivent être reconcentrés sous vide à une température inférieure à 40°C (Iwasaki *et al.* 2007 [191]). Même automatisée, la procédure est plus longue que les autres techniques de SPE.

- L'extraction sur phase solide magnétique (MSPE)

De nouvelles phases adsorbantes sont développées pour le SPE grâce à l'apport des nanotechnologies. Elles présentent des propriétés magnétiques, mécaniques et optiques et l'adsorption repose sur des phénomènes d'attraction. Elles peuvent être fonctionnalisées afin d'être plus sélectives et présenter une plus grande surface de contact spécifique (Villaverde *et al.* 2016 [189]).

La MSPE a été introduite en 1999 (Ibarra 2015 [188]). La phase adsorbante possède des propriétés magnétiques. Des particules, généralement de la magnétite Fe₃O₄, est recouverte d'une couche de composés organiques. L'adsorbant est dispersé dans le liquide et les analytes s'adsorbent à sa surface selon différentes interactions (Figure I-52, B). L'adsorbant est isolé et les analytes sont désorbés avec le solvant approprié.

Cependant, ces phases adsorbantes magnétiques présentent une spécificité excessive et ne sont pas adaptées pour la récupération des composés polaires pour lesquels les taux de recouvrement sont faibles. Des nanoparticules polymériques magnétiques équilibrés hydrophile-lipophile ont été développées récemment pour permettre la récupération des analytes aussi apolaires que polaires (Villaverde *et al.* 2016 [189]). Les taux de recouvrement obtenus pour des pesticides dans des fruits et légumes varient entre 71,5 et 111,5 %, 95-98,5% pour le linuron dans les pommes et les laitues, 83,6-94,5 %, 72,1-118,4 % et 81,4-112,6 % respectivement pour le dicofol, les pyréthriinoïdes et les organophosphorés dans le thé, 84,3-90,9 % pour le chloramphénicol dans le miel (Ibarra *et al.* 2015 [188]).

- La dispersion sur matrice solide (MSPD) (Sobhandazeh *et al.* 2014 [176], Fenik *et al.* 2011 [177], Wilkowska et Biziuk 2011 [178])

La MSPD a été décrite en 1989 pour extraire les analytes d'intérêt à partir de matrices solides. Elle consiste à homogénéiser finement au mortier ou par un moyen mécanique adaptée la matrice solide avec un support solide, la plupart du temps des silices greffées en phase inverse C8 et C18 pour leur affinité avec les molécules lipophiles d'intérêt. La silice et le Florisil sont également utilisés. D'autres supports inertes comme les terres de diatomées et le sable ont été utilisés avec succès pour l'analyse des pesticides dans les jus de fruits, les aliments et les tissus gras car ils séparent les interférents matrices là où n'importe quel autre adsorbant ne les retient pas (élution en tête de colonne). Après dispersion, le solide est transféré sur une colonne et les analytes sont élués sélectivement par solvant (hexane, acétate d'éthyle, dichlorométhane, eau, méthanol, éthanol, heptane, acétonitrile,

éther de pétrole, des mélanges tels que : hexane / acétate d'éthyle, hexane dichlorométhane, dichlorométhane / acétate d'éthyle, acide acétique / éthanol / heptane, hexane / eau, des solvants saturés tels que acétonitrile saturé par hexane, par éther de pétrole...). Elle est donc assez simple à mettre en place, ne nécessite pas d'équipement ou d'investissement important. Les volumes de solvants mis en jeu restent faibles. Les quantités d'adsorbants peuvent être élevées.

La MSPD a été appliquée pour le dosage des herbicides dans les huiles d'olive (silice greffée aminopropyle) avec des taux de recouvrement compris entre 81 et 111 %, de pesticides dans les jus de fruits (terres de diatomées/téflon) avec des taux de recouvrement entre 71 et 118 %, le dosage de la cyperméthrine et de la deltaméthrine dans des tissus à teneur élevées en lipides - foie, muscles, cœur et reins de porc - (alumine neutre/terres de diatomées) avec des taux de recouvrement entre 87,8 et 105,3 %...

- Les pipettes Disposable Pipette Xtraction (DPX)

Les pipettes DPX sont similaires aux cartouches de SPE. Le principe est identique mais concerne de très faibles volumes. Il y a une phase de conditionnement de l'adsorbant, une phase de séparation durant laquelle l'échantillon est mélangé à l'adsorbant et enfin une phase de désorption qui solubilise les analytes d'intérêt (Figure I-52, C). Dans le cas de la purification des pesticides, c'est l'éluat qui contient les analytes d'intérêt et non le rétentat de l'adsorbant.

Les pipettes ont été utilisées avec succès en tandem avec le kit QuEChERS de Restek dans le cadre d'une analyse multirésidus de 200 pesticides par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse tandem (Cabrices 2013 [192]). La purification complémentaire par DPX sur un extrait de pomme se traduit par un changement de couleur significatif de l'extrait (Figure I-52, C).

Des pipettes DPX contenant 75 mg de MgSO₄, 25 mg de PSA et 12,5 mg de GCB ont été utilisées à la place de la DSPE pour purifier 500 µL d'extraits QuEChERS (Cf. 5. 1. 3.) de fruits et légumes (Kaewsuya *et al.* 2013 [193]). Guan *et al.* en 2010 [194] ont extrait par DPX les résidus phytosanitaires non polaires d'extraits acétone de fruits et de légumes pour les analyser ensuite par chromatographie gazeuse couplée à un détecteur à capture d'électrons et un détecteur azote phosphate.

- La microextraction en phase solide (SPME) (Sobhandazeh *et al.* 2014 [176], Fenik *et al.* 2011 [177], Wilkowska et Biziuk 2011 [178])

La technique a été inventée par Pawliszin *et al.* au début des années 90. Une fibre recouverte de phase stationnaire est utilisée pour extraire les analytes d'intérêt à partir de matrices solides, liquides ou gazeuses (Figure I-52, D). L'usage de solvants peut être tout simplement évité. Il existe différentes phases stationnaires parmi lesquelles la phase polydiméthylsiloxane (PDMS) a été la plus utilisée. L'analyse consiste en une sorption des analytes par immersion de la fibre (DI-SPME) ou en espace de tête (HS-SPME) puis d'une désorption à chaud dans l'injecteur split-splitless d'un chromatographe en phase gazeuse. L'investissement est faible (les injecteurs classiques des chromatographes peuvent être utilisés) et les fibres ont une relativement longue durée de vie surtout lorsqu'elles sont utilisées en espace de tête. Le chromatographe peut être équipé d'un passeur automatique (Gerstel, Thermo Scientific). Une interface spécifique de désorption a été

développée récemment pour le couplage SPME-HPLC. Cependant, la reproductibilité est un problème et les taux de recouvrement sont relativement faibles.

Cette technique est utilisée pour l'analyse des organochlorés et des organophosphorés en raison de leur stabilité thermique et de leur volatilité : extraction d'organophosphorés notamment par HS-SPME de pommes, tomates et jus de pommes, d'insecticides organophosphorés par HS-SPME de fraises et de cerises, de pyréthriinoïdes dans les fraises, de résidus phytosanitaires dans les légumes (Fenik *et al.* 2011 [177]). Les fibres en polyacrylate (PA) ont été utilisées pour extraire des organophosphorés des fruits et des matrices biologiques, des herbicides dans les légumes, le vin et les fraises. Le PDMS a été mis en œuvre pour extraire des organophosphorés, organochlorés et pyréthriinoïdes dans des matrices huile d'olive, eaux, thés et infusions, miel. De nombreux pesticides, des organochlorés, le fénitrothion et ses métabolites, les herbicides dérivés de la phénylurée et des carbamates ont été extraits par des fibres mixtes PDMS/DVB (divinylbenzène) dans des matrices telles que eaux, jus de fruits (Sobhandazeh *et al.* 2014 [176])...

- La technique Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) (Sobhandazeh *et al.* [176])

La SBSE est une méthode d'extraction par sorption sur un polymère de PolyDiMethySiloxane (PDMS) de contaminants organiques dissous en phase aqueuse la plupart du temps. Les barreaux sont simplement immergés dans le milieu à analyser (Figure I-52, E). Elle est utilisée pour extraire molécules apolaires ou très peu polaires (coefficient de partage octanol-eau $\text{Log}K_{O/E} > 3$ - Note Cèdre R&D N°09-1¹) telles que des solvants halogénés, des composés aromatiques volatils, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et les pesticides biphényles polychlorés (PCB), les composés odorants et les composés organiques en général. En raison du caractère très apolaire du PDMS, la méthode n'est pas très efficace pour l'extraction de composés polaires, sauf lorsque ceux-ci ont été préalablement dérivatisés. Dans le cas de composés très polaires, la dérivatisation ne produit pas suffisamment d'espèces hydrophobes pour permettre une extraction suffisante par le PDMS. Le barreau peut être directement désorbé dans une unité de désorption thermique (désorption thermique ou injecteur PTV) (Cèdre N°09-1) ou bien désorbé chimiquement (Margoum *et al.* 2010 [195]). La norme AFNOR T90-210 (2009) décrit l'extraction des pesticides dans l'eau par SBSE, suivie d'une désorption liquide pour analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. Les limites de quantification restent assez élevées : de 0,02 à 1 µg/L (CEMAGREF, 2010). En règle générale, les barreaux sont immergés dans un prélèvement de plusieurs dizaines de millilitres d'eau, mais ils ont été utilisés *in situ* dans des cours d'eau avec succès (Margoum *et al.* 2010 [195]). Même si cette technique est largement utilisée dans l'analyse des eaux, elle peut trouver d'autres applications, comme l'extraction des pesticides présents dans du safran (Maggi *et al.* 2008 [196]), six pesticides extraits du raisin avec des taux de recouvrement de 15 à 100 %, des organophosphorés extraits du concombre, de la pomme de terre et du miel, des pyréthriinoïdes extraits de l'eau, des organochlorés extraits des sédiments avec des taux de recouvrement compris entre 73,9 et 106 % (Sobhandazeh *et al.* 2014 [176])...

¹ <http://www.cedre.fr/fr/publication/recherche-developpement/news-09-1.pdf>

- Les techniques chromatographiques séparatives (Fenik *et al.* 2011 [177])

La chromatographie d'adsorption (chromatographie planaire telle que la chromatographie sur couche mince CCM) et la chromatographie par perméation de gel (GPC) sont utilisés en tant que techniques séparatives pour la purification des extraits. En GPC, la séparation est basée sur la différence de masses entre les pesticides (masses moléculaires faibles généralement < 500 Da, Cf. § 3. 3. 2.) et les analytes matrices (masses moléculaires souvent plus élevées). Cependant la résolution est plus limitée que pour les techniques de chromatographie planaire, surtout en mode gradient d'élution. La GPC a été mise en œuvre pour séparer des pesticides de matrices telles que des fruits frais (oranges, pommes, pêches, poires, pamplemousses...) et des légumes (laitue, tomates, choux, pommes de terre, oignons, poireaux...).

La CCM peut être utile dans le cadre de l'analyse des résidus phytosanitaires (*i*) soit à la place de la SPE dispersive (dSPE, Cf. § 5. 1. 3.) (Oellig et Schwack 2011 [197]), (*ii*) soit en complément de la DSPE si l'étape de purification est nécessaire (Sherma 2010 [198]). Oellig & Schwack ont développé une méthode de purification par CCM dans laquelle les pesticides sont focalisés en un point de la plaque de silice greffée NH₂. Les pesticides sont récupérés par l'interface TLC/MS de CAMAG et analysés en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. Ils comparent l'efficacité de deux techniques de purification : la SPE dispersive sur adsorbant PSA et la CCM par rapport aux extraits bruts. Les taux de recouvrement obtenus montrent que la CCM est une alternative efficace et bon marché aux différentes étapes de purification (SPE dispersive, SPE sur colonne, chromatographie par perméation de gel) avec des taux de recouvrement de sept pesticides (Acétamipride, pirimicarb, fénarimol, azoxystrobine, mépanipirim, penconazole et chlorpyrifos) dans des extraits de pomme compris entre 97 et 102 %. Les taux de recouvrement dans les extraits bruts et dans les extraits purifiés par DSPE sont respectivement de 90-112 % et 88-115 %.

Le développement continu de la CCM haute performance (CCMHP) permet aujourd'hui de mettre en place des couplages très performants avec des outils spectroscopiques tels que la spectrométrie de masse, la spectroscopie UV-Visible, la spectroscopie InfraRouge et même la Résonance Magnétique Nucléaire (Camag Bibliography Service Planar Chromatography CBS 110, Mars 2013). Il existe des méthodes de détection bioautographiques pour les antioxydants, les antifongiques et antibactériens, les pesticides Marston 2011 [199])... Dans le cas des pesticides organophosphorés, inhibiteurs de l'acétylcholinestérase, la CCMHP a été couplée à une détection enzymatique (Mendoza 1973 [200], Mendoza et Shields 1973 [201], Mendoza *et al.* 1968 [202,203], Weins et Jork 1996 [204]).

5. 1. 3. La méthode QuEChERS

QuEChERS est l'acronyme de « Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe ». Il s'agit d'une méthode combinée d'extraction et de purification en quelques étapes qui marquent un gain de temps considérable et une simplification significative (durée de préparation des extraits, volumes de solvants, verrerie...) des préparations traditionnelles effectuées jusqu'alors. Elle a été mise au point en 2003 par Anastassiades *et al.* [205].

Parmi les trois solvants les plus courants pour l'extraction des pesticides qui assurent un spectre suffisamment large de récupération (Cf. § 5. 1. 1.), l'acétonitrile est le solvant de choix pour l'extraction par la méthode QuEChERS. L'acétone est miscible à l'eau et sans l'usage de solvants apolaires, il est impossible de séparer les phases. Quant à l'acétate d'éthyle, même si sa solubilité

dans l'eau est faible (87 g/L à 20°C), les phases se séparent sans ajout de tiers solvants apolaires. Toutefois, les composés fortement polaires ne sont pas récupérés. L'acétonitrile ne présente pas ces désavantages et par ailleurs, la quantité d'analytes matrices co-extraits y est plus faible que dans l'acétone et l'acétate d'éthyle (Wilkowska et Biziuk 2011 [178], Gonzales-Curbelo *et al.* 2015 [206]). De plus, l'extrait peut être directement analysé par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (Cf. § 5. 2.). En revanche, pour une analyse par chromatographie gazeuse, il est préférable de changer le solvant car le volume d'expansion de l'acétonitrile pendant la phase de vaporisation est élevé (Gonzales-Curbelo *et al.* 2015 [206]). Dans ce cas, l'extrait doit être évaporé à sec et repris dans un solvant plus approprié tel que l'iso-octane, l'hexane, l'acétate d'éthyle, le toluène ou dans des mélanges de ces solvants.

A l'origine, la méthode développée par Anastassiades *et al.* implique deux étapes (i) une extraction par solvant suivie d'une séparation aidée par l'ajout de sels, et (ii) une purification par SPE dispersive (SPEd). La nature et la quantité des sels ont été optimisés. Le sulfate de magnésium $MgSO_4$ apporte la meilleure séparation liquide-liquide tout en favorisant l'extraction des pesticides, particulièrement apolaires, grâce à l'élévation de température qu'entraîne sa réaction exothermique avec l'eau (40-45°C). Pourtant, certains pesticides sont sensibles à cette élévation de température et peuvent être perdus. Il est préférable de procéder à l'extraction des matrices congelées ou de rajouter de l'eau inférieure à 4°C. Le chlorure de sodium NaCl limite la co-extraction des interférents matrices (Gonzales-Curbelo *et al.* 2015 [206]). Les sels sont ajoutés avec un ratio $MgSO_4/NaCl$ de 4 :1. Les phases adsorbantes utilisées dans l'étape de purification sont de nature à éliminer par adsorption les interférents de la matrice provenant de la phase antérieure d'extraction :

- les adsorbants à base de PSA retiennent les acides gras, les acides organiques polaires, les pigments polaires (anthocyanes) et les sucres,
- les adsorbants à base de GCB retiennent les pigments tels que les chlorophylles, les caroténoïdes, les interférents apolaires, et les stérols mais aussi les pesticides de configuration plane (Gonzales-Curbelo *et al.* 2015 [206]) tels que le cyprodinil, le coumaphos... (taux de recouvrement compris entre 20 et 60 % - Zhao *et al.* 2012 [207]),
- les adsorbants greffés octadécyle C18 retiennent les interférents apolaires tels que les lipides.

L'utilisation du PSA dans la SPEd pose un problème de pH : les extraits sont généralement plutôt basiques, mettant en jeu la stabilité (hydrolyses, ionisations) de certains analytes d'intérêt comme le captane, le folpet... Il fallait stabiliser le pH autour de 5 par ajout d'acide formique. Par la suite, la méthode a été affinée et l'usage de tampons acétate et citrate au cours de l'étape d'extraction a pu améliorer la récupération des analytes d'intérêt sensibles au pH (Villaverde *et al.* 2016 [189], Gonzales-Curbelo *et al.* 2015 [206]). Toutefois, dans certaines matrices alimentaires, notamment celles contenant un taux de lipides élevé, l'extraction en milieu tamponné diminue la capacité de rétention du PSA et augmente par conséquent la quantité d'interférents matrices (Gonzales-Curbelo *et al.* 2015 [206]). Quant à l'optimisation de l'étape de purification, elle consiste à utiliser des adsorbants en mélange plutôt que d'augmenter les quantités d'adsorbant pur qui engendrent souvent des pertes d'analytes d'intérêt : augmenter le PSA dans le cas des matrices à teneurs élevées en lipides comme les céréales entraîne une perte de 20 % de certains pesticides polaires, le GCB utilisé pour éliminer les pigments entraîne une perte de 25 % de certains pesticides de structure plane. Il vaut mieux associer PSA et GCB pour éliminer les chlorophylles dans les matrices vertes (épinards, laitue, feuilles...) (Gonzales-Curbelo *et al.* 2015 [206]).

Notons que les matrices contenant entre 2 et 20 % de lipides (œufs, lait, céréales, oléagineux, poissons, viandes, avocats, fruits à coque...) peuvent renfermer des pesticides aussi bien lipophiles qu'hydrophiles. La méthode de préparation des extraits se doit de refléter la gamme de polarités des pesticides présents. En revanche, les matrices contenant plus de 20 % de lipides (huiles végétales, beurre, graisses animales...) ne renferment que des pesticides apolaires. La méthode QuEChERS est particulièrement adaptée dans ces cas (Wilkowska et Biziuk 2011 [178]). Les pesticides fortement polaires dont le coefficient de partage $\log K_{O/E}$ est inférieur à -2 (fosétyl, glyphosate...) ne sont pas de bons candidats pour le QuEChERS car ils ne se séparent pas dans la phase organique compte tenu de leur faible solubilité dans l'acétonitrile. D'autres méthodes plus appropriées doivent être utilisées (Villaverde *et al.* 2016 [189]).

Aujourd'hui, la méthode QuEChERS est officiellement une méthode standardisée de préparation d'extraits pour l'analyse des fruits et légumes, reconnue par l'AOAC International et le Comité Européen de Normalisation (CEN) (Villaverde *et al.* 2016 [189]).

L'extraction par solvant en milieu tamponné décrite par la norme AFNOR NF EN 5662 consiste en une extraction des analytes d'intérêt, la plupart du temps par l'acétonitrile et des sels de chlorure de sodium, de citrate de trisodium dihydraté, citrate de disodium hydrogène sesquihydraté et de sulfate de magnésium, suivie d'une purification par SPED. Aujourd'hui, de nombreux kits prêts à l'emploi et qui couvrent différentes méthodes : en milieu non tamponné, selon la norme européenne EN 15662 ou AOAC 2007.01... et proposent différents adsorbants pour purifier les extraits (PSA, GCB et C18), existent sur le marché : Restek, Agilent, Waters, Macherey Nagel, Phenomenex, Carlo Erba, Interchim, Sigma Aldrich...

Les étapes de préparation de l'extrait pour analyse sont représentées dans la Figure I-53. La matrice alimentaire est réduite en une purée homogène et représentative (A). Environ 10 g sont pesés avec précision dans un tube à centrifuger (B) puis 10 mL d'acétonitrile sont ajoutés et homogénéisés pendant une minute (C). Le ratio échantillon/solvant de 1 :1 a été optimisé pour un recouvrement quantitatif des analytes d'intérêt (Gonzales-Curbelo *et al.* 2015 [206]). Le mélange de sels en sachet est ajouté et homogénéisé pour parfaire la séparation (D). Le tube est centrifugé (E) et un aliquot de la phase organique est prélevé pour être purifier dans un tube à centrifuger de SPED (F). Le tube est homogénéisé pendant 30 secondes puis centrifugé. La phase organique purifiée est récupérée pour être analysée (H).

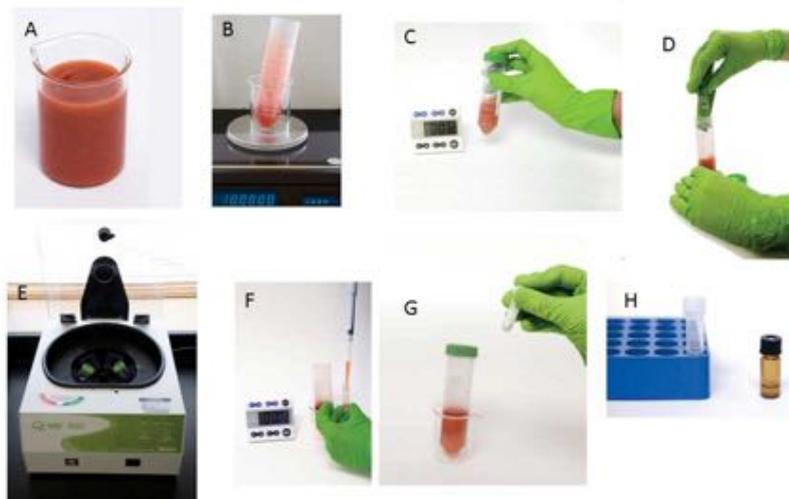


Figure I-53 : Illustration des étapes de préparation de l'extrait de pesticides à partir d'une matrice fruit (Restek)

5. 2. Les méthodes d'analyse

Les pesticides peuvent être quantifiés de différentes façons : dosage du dithianon par spectrophotométrie UV (Verma *et al.* 1999 [208]), identification du boscalid dans des jus de fruits par des tests enzymatiques (Abad-Fuentes *et al.* 2012 [209]), par des mesures biologiques telle que l'inhibition de l'acétylcholinestérase dans le cas du captane et des organophosphorés (Roepcke *et al.* 2010 [210], Choi *et al.* 2003 [211]), par des mesures de radioactivité à partir de pesticides marqués au ¹⁴C qui ont notamment permis de mieux comprendre les phénomènes de sorption dans les pommes (Mota-Sanchez *et al.* 2012 [146])...

Mais lorsqu'une séparation préalable à leur détection et leur quantification est nécessaire, trois techniques chromatographiques de séparation sont utilisées : (i) la chromatographie en phase gazeuse (CPG), (ii) la chromatographie liquide haute performance (CLHP) et (iii) la chromatographie sur couche mince (CCM) (Plonka *et al.* 2016 [212]).

5. 2. 1. La chromatographie en phase gazeuse

La CPG trouve son application dans l'analyse des molécules volatiles ou semi-volatiles et stables thermiquement (Cserhati et Szogyi 2012 [213]). Certaines molécules phytosanitaires ne sont pas analysables par CPG du fait de leur sensibilité thermique et de leur polarité. C'est le cas notamment du captane qui se dégrade dans l'injecteur en tétrahydroptalimide (Banerjee *et al.* 2010 [214]). Mais de nombreux pesticides tels que les pyréthriinoïdes, les organophosphorés, les pyridines, les triazoles, les phénylpyrazoles... sont analysés par CPG (Plonka *et al.* 2016 [212]).

L'injection est une étape cruciale en CPG, à l'origine de la plupart des problèmes analytiques survenant en CPG/SM. Il existe deux méthodes d'injection : à chaud et à froid. L'injection à chaud avec ou sans division (split-splitless), est la plus simple et la plus répandue. Elle est robuste (excellente répétabilité pour les faibles volumes injectés) et permet de minimiser les pertes peu recommandées lors des analyses de traces. Cependant, justement les faibles volumes injectés (maximum 2 µL) et la discrimination de ce type d'injecteur (les interférents matrices non volatils ne sont pas retenus) sont responsables d'une diminution de la sensibilité (effets matrices, Cf. § 5. 3.). Par conséquent, ils sont peu recommandables pour des matrices complexes. L'injection à froid (injecteurs-vaporisateurs à température programmable PTV et les injecteurs on-column) représente une alternative efficace aux principaux inconvénients de l'injection à chaud. Les volumes injectés sont plus élevés, de l'ordre de 5 à 10 µL. Les effets matrices sont réduits grâce à l'évent de split ou au liner (Sobhandazeh *et al.* 2014 [176]). Le choix de la colonne et de sa phase stationnaire est également important pour une séparation optimale des analytes d'intérêt en vue de leur analyse qualitative et quantitative (Fenik *et al.* 2011 [177]).

La CPG peut être couplée à différents détecteurs (Fenik *et al.* 2011 [177], Biziuk et Stocka 2015 [190], Granier *et al.* 2001 [216], Périquet *et al.* 2004 [216]) :

- les détecteurs à capture d'électron (DCE), spécifiques des composés contenant des atomes électronégatifs tels que organohalogénés (organochlorés) et les pyréthriinoïdes;
- les détecteurs à photométrie de flamme (DPF), spécifiques des organosoufrés et des organophosphorés ;
- les détecteurs azote phosphate (DNP), spécifiques des organonitrophosphorés et organophosphorés,

- les détecteurs thermo-ioniques (DTI) pour les organoazotés et les organophosphorés,
- les détecteurs coulométriques (Hall) pour les organochlorés en mode chlore ;
- les détecteurs de masse (SM) universels, permettant la détection simultanée de tous les composés analysables en CPG.

Concernant la spectrométrie de masse, le choix du mode d'ionisation (impact électronique ou ionisation chimique avec un gaz réactif tel l'ammoniac NH_3 ou le méthane CH_4) dépend de la nature de l'échantillon et du type d'analyse (sélection d'une classe chimique spécifique ou multiésidus) (Raina 2011 [217]) :

- la présence de molécules co-éluées et d'analytes co-extraits de la matrice suppose l'utilisation d'une ionisation par impact électronique,
- des molécules contenant des halogènes, des groupes NO_2 ou P seront mieux analysées après une ionisation chimique négative.

Les organochlorés et certains de leurs métabolites, les pyréthriinoïdes, les organophosphorés, les triazines et certains de leurs métabolites, les phénylurées et certains de leurs métabolites sont analysables par CPG sans dérivatisation préalable. Certains métabolites des organophosphorés, des pyréthriinoïdes et certaines classes de phytosanitaires plus polaires tels que les herbicides phénoxyacides et les carbamates peuvent être analysés par CPG après dérivatisation. Les dicarboximides, dinitroanilines, dinitrophénols et dithiocarbamates ont été peu analysés en CPG. Il existe de nombreuses molécules phytosanitaires très polaires qui répondent très faiblement en CPG : faible stabilité dans les injecteurs, dans les détecteurs de masse, faible ionisation... Les phényl urées, sulfonylurées et la plupart des dithiocarbamates ne sont pas sensibles en CPG (Raina 2011 [217]). Par exemple, les organophosphorés et les organochlorés ont été analysés par CPG/DCE, les pyréthriinoïdes par CPG/DIF, les organophosphorés, des pyréthriinoïdes, des fongicides dérivés de la strobilurine et de l'oxazole par CPG/SM, des organophosphorés ont été analysés par CPG/DNP, des fongicides dérivés de l'azole ont été détectés par CPG/SM en mode positif d'ionisation chimique avec des LD inférieures à $10 \mu\text{g}/\text{kg}$, des acaricides organochlorés ont été analysés par CPG couplée à un DCE, DNP et SM avec des limites de quantification (LQ) de 0,1 à 0,3 mg/kg pour les détecteurs DCE ET DNP respectivement et entre 18 et $85 \mu\text{g}/\text{kg}$ pour le SM (Cserhati et Szogyi 2012 [213]). Mais parfois, les limites de détection en spectrométrie de masse sont plus élevées que dans le cas des détecteurs spécifiques : les LD obtenues pour des organophosphorés par CPG/DPF dans des matrices fruits ont été évaluées entre 0,003 et $0,009 \mu\text{g}/\text{kg}$ ou inférieures à $0,15 \mu\text{g}/\text{kg}$ dans des matrices légumes par CPG/DTI contre des LOD de $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ en CPG/SM (Fenik *et al.* 2011 [177]). Le couplage de la CPG avec la masse tandem SM^2 (Cf. § 5. 2. 3) a conduit à la diminution des LD jusqu'à un facteur 200000 (Tableau I-23). D'autres exemples figurent dans le Tableau I-25.

<i>Familles chimiques</i>	<i>Matrices</i>	<i>Détecteur</i>	<i>LD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)</i>
Multi classes	Fruits et légumes	SM	0,4-1000,0
Multi-classes	Céréales	SM	12,5-500,0
Organophosphorés, organochlorés, carbamates, dicarboximides, sulfanilamides	Fruits et légumes	SM	50-250
Multi-classes	Fruits et légumes	SM ²	0,01-2
Organophosphorés, organochlorés	Fruits et légumes	SM ²	0,005-5,000
Organophosphorés, organochlorés, pyréthriinoïdes	Fruits et légumes	SM ²	0,07-4,00
Organophosphorés, organochlorés, fongicides, herbicides	Fruits et légumes	SM ²	1-5
Organophosphorés, organochlorés, pyréthriinoïdes, organoazotés	Fruits et légumes	SM ²	0,01-35

Tableau I-23 : Gain de la masse tandem par rapport à la masse simple dans le couplage avec le chromatographie en phase gazeuse pour l'analyse des pesticides d'après El Mrabet 2008 [218]

Notons enfin que la chromatographie gazeuse bi-dimensionnelle est utilisée pour sa capacité de résolution élevée, sa plus grande sensibilité et la clarté des informations qu'apportent les chromatogrammes. La seconde dimension correspond à une chromatographie rapide. La plupart du temps, la chromatographie gazeuse bi-dimensionnelle est couplée à un détecteur de masse. Mais l'investissement est très important. Pour réduire les durées d'analyse et obtenir une meilleure précision, la chromatographie rapide met en œuvre des colonnes plus courtes, avec des diamètres internes et des épaisseurs de phase stationnaire très faibles (0,1 μm) (Fenik *et al.* 2011 [177], Villaverde *et al.* 2016 [189]).

5. 2. 2. La chromatographie liquide haute performance

Il y a environ 30 ans, seuls quelques échantillons de polluants environnementaux étaient analysés par chromatographie liquide (Sobhandazeh *et al.* 2014 [176]). Aujourd'hui, c'est l'une des techniques les plus employées, avec des limites de détections de l'ordre de 0,005 mg/kg. Elle est utilisée pour le dosage des composés non volatils, thermosensibles et polaires. Elle convient aussi bien à l'analyse des composés solubles dans l'eau que ceux insolubles (Cserhati et Szogyi 2012 [213]). De nos jours, les industries de phytochimiques développent des molécules plus polaires, moins volatiles et plus facilement biodégradable de façon à éviter la bioaccumulation et limiter les transferts dans l'atmosphère. La CLHP se prête idéalement à l'analyse de ces nouvelles molécules (Villaverde *et al.* 2016 [189]).

Les colonnes sont généralement en silice greffée RP-C18 et les gradients utilisés classiquement sont des mélange eau-acétonitrile ou eau-méthanol dans des gammes de pH allant de 3 à 9 (Plonka *et al.* 2016 [212], Périquet *et al.* 2004 [216]).

La CLHP peut être couplée à des détecteurs UV et à barrette de diodes pour des molécules absorbant en UV, généralement entre 220 et 325 nm (Plonka *et al.* 2016 [212]). Des fluorimètres peuvent également être couplés pour des molécules fluoresçant naturellement ou après dérivatisation (insecticides de la famille des carbamates après dérivatisation au mercaptoethanol) (Périquet *et al.* 2004 [216]). Mais le couplage le plus courant reste celui avec les spectromètres de masse (Ticha *et al.* 2008 [166], Sinha *et al.* 2012 [219], Barganska *et al.* 2014 [220]). Le couplage avec la spectrométrie de masse a apporté un gain de sensibilité d'un facteur compris entre 50 et 250. En CLHP/UV, les LQ varient de 0,002 à 0,01 mg/kg tandis qu'en CLHP/MS², elles sont comprises entre 0,0005 et 0,01 mg/kg (El Mrabet 2008 [218]).

Il existe deux modes d'introduction de l'échantillon dans le spectromètre de masse (Sobhandazeh *et al.* 2014 [176]) :

- l'introduction dans la source d'ions du spectromètre (faisceau de particules),
- le thermospray ou les interfaces d'ionisation à pression atmosphérique (API) qui permettent des ionisations douces. Les interfaces API regroupent l'électrospray (ESP), l'ionspray (ISP) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI). L'ISP a été développé par Bruins *et al.* pour optimiser l'évaporation des ions de l'ESP. Le principal avantage réside dans l'admission de débits d'éluant plus élevés de l'ordre de 40-50 $\mu\text{L}/\text{min}$, compatibles avec des diamètres intérieurs de colonne de chromatographie liquide de 1 mm.

Les instruments de CLHP/SM avec une interface API (le plus souvent ESP ou APCI) sont les plus utilisés pour l'analyse des traces (Hajslova et Zrostlikova 2003 [221]). L'interface ESP se caractérise par l'ionisation la plus douce et une sensibilité élevée, meilleure que l'interface APCI dans le cas des herbicides cationiques et anioniques. Elle est idéale pour des composés thermolabiles et très polaires. Le domaine de linéarité est plus large pour l'interface APCI et la LD est plus basse. Elle est conseillée pour des composés faiblement basiques, des pesticides tels que les triazines et les herbicides tels que les phénylurées. Elle présente une meilleure sensibilité que l'interface ESP pour les pesticides neutres et basiques. Mais le mode négatif est moins sensible que celui de l'interface ESP (Sobhandazeh *et al.* 2014 [176]). En règle générale, le mode positif ou négatif d'ionisation dépend de la polarité et de l'acidité des analytes et des impacts sur la matrice de l'échantillon (Tableau I-24) (Raina 2011 [217]).

Mode	ESP+	ESP-	APCI+	APCI-
Analytes	Organophosphorés, carbamates, strobilurines, pyrétroïdes, nicotinoïdes, néonicotinoïdes, sulfonylurées, phénylurées, pyridines, pyrimidines, organothiophosphates, chloroacétanilides, ammoniums IV, triazoles, morpholines, diphenyl-éthers, quinazolines, hydroxylanilides, phenoxy-pyrazoles, carboxamides, oxadiazines, pyridazines, benzohydrazides, pyrazolamides, imidazoles, benzimidazoles, hydroxylanilides, conazoles, phénylamides, spiracétalamines, phénylaminopyrimidines, aryloxyacides, triazines, phénoxy-pyrazoles, oxyacétamides, thiazolidinones, nitrométhylènes, phénylamides, azométhines, pyridazines, acides cinnamiques, benzylurées, macrolides	Phénoxyacides et leurs métabolites, métabolites des chloroacétanilides, dinitroanilines, benzohydrazides	Carbamates, néonicotinoïdes, triazines, chloroacétanilides, benzimidazoles, imidazoles, carboxamides	Dérivés nitrés, triazoles, biphenyls, imidazoles, thiophosphates
	Organophosphorés, carbamates, strobilurines, triazines, phénylurées, aryloxyacides, chloroacétamides, benzimidazoles, hydroxylanilides, imidazoles, triazoles azométhines, pyridines, azoles, benzylphénylurées, N-méthylcarbamates, sulfonylurées, benzonitriles, cyclohexanones, phénylaminopyrimidines, hydrazides, benzylurées, morpholines, phénylpyrroles, oxadiazines, urées, oxazoles, phénylamides, pyridazines, pyridines, spiroacétalamines			

Tableau I-24 : Modes d'ionisation et nature des phytosanitaires d'après Raina 2011 [217] et El Mrabet 2008 [218]

Récemment, le développement de technique de chromatographie liquide haute performance ultra rapide (UCLHP) a permis de réduire considérablement les durées d'analyse parfois de moitié ainsi que d'augmenter la sensibilité (augmentation du ration signal/bruit, pics plus fins). Les phases stationnaires des colonnes supportent des pressions très élevées jusqu'à plus de 400 bars et admettent des débits de phase mobile plus grands (Villaverde *et al.* 2016 [189]). Elle peut être couplée à plusieurs détecteurs de masse tels que le détecteur de temps de vol (QTOF) et un détecteur de masse à simple quadrupôle afin d'optimiser à la fois la durée d'analyse, la séparation des analytes, l'identification et la quantification dans des matrices complexes (UHPLC/QqTOF/MS) (Biziuk et Stocka 2015 [190], Frenich *et al.* 2014 [222]).

5. 2. 3. Les détecteurs de masse et les méthodes multirésidus

Les détecteurs de spectrométrie de masse sont de plusieurs nature : simple quadripôle, triple quadripôle, trappe d'ions, analyseur de temps de vol (TOF), Orbitrap. Les quadripôles simples ou les analyseurs à trappe d'ions en mode Single Ion Monitoring (SIM) permettent une analyse quantitative des pesticides (Abdulra'uf et Tan 2013 [223], Chen *et al.* 2011 [224], Cunha *et al.* 2009 [225]). En spectrométrie de masse simple, la principale limitation à l'analyse de pesticides réside dans le manque de discrimination entre les interférents de la matrice et les analytes d'intérêt lorsqu'ils sont co-élués et forment des ions de rapport m/z identiques (faux positifs). Il manque des données en terme d'identification et le bruit de fond est également très élevé. Le défaut d'identification est un problème d'autant plus important que les matrices sont complexes et que le nombre de pesticides à analyser dans une seule injection est élevé. Quant au bruit de fond, il contribue à diminuer les valeurs des LD et des LQ (El Mrabet 2008 [218]). Les analyseurs de temps de vol (TOF) apportent des données remarquables en matière d'identification des molécules. En haute résolution, l'erreur de masse est inférieure à 2 mDa. Il est possible d'identifier des composés inconnus même en l'absence d'étalons. Mais ils sont relativement chers et ne sont pas très pertinents dans le cadre d'analyses de routine (contrôle des LMR). Mais ils peuvent être couplés avec d'autres détecteurs de masse en CLHP et UCLHP (Biziuk et Stocka 2015 [190], Frenich *et al.* 2014 [222]) et conviennent particulièrement bien au couplage avec la CPG rapide et la CPG bi-dimensionnelle (Villaverde *et al.* 2016 [189]). Plusieurs couplages des détecteurs à haute résolution Orbitrap ont été étudiés dans la littérature pour l'analyse des pesticides dans les fruits et les légumes, notamment pour l'évaluation des faux positifs. Comme les TOF, ils sont souvent utilisés pour l'identification des analytes non ciblés (Villaverde *et al.* 2016 [189]). Aujourd'hui, les détecteurs les plus sensibles et les plus sélectifs en matière d'analyse de denrées alimentaires et de polluants environnementaux sont les détecteurs de masse tandem : trappes d'ion et triples quadripôles en mode Multiple Reaction Monitoring (MRM) ou Selected Reaction Monitoring (SRM) (Biziuk et Stocka 2015 [190], Cherta *et al.* 2013 [226], Martins *et al.* 2012 [227], Fillatre *et al.* 2011 [228]). Les couplages CLHP avec des détecteurs de type triple quadripôle, temps de vol et Orbitrap permettent d'atteindre des LQ de moins de 5 g/kg à moins de 25 µg/kg après extraction par QuEChERS (Frenich *et al.* 2014 [222]). Plus d'informations figurent dans le Tableau I-25. Le principe de la masse tandem consiste à effectuer des acquisitions en mode SM^2 sur plusieurs composés et en mode SM^n dans le cas des trappes d'ions. Dans le mode SM^n , la trappe est remplie, les ions sont isolés puis fragmentés pour obtenir des ions fils issus de (n-1) fragmentations successives. Néanmoins, les détecteurs à trappe d'ions présentent quelques inconvénients dont celui de ne pas capturer les fragments de rapport m/z faible. Or dans le cas des molécules de phytosanitaires, les masses sont relativement faibles (Cf. § 3. 3. 2. et Tableau I-10). La première fragmentation SM^2 conduit à des ions de rapport m/z la plupart du temps faibles qui ne peuvent pas être de nouveau fragmentés (El Mrabet 2008 [218]).

Il y a 30 ans, deux à trois molécules pouvaient être analysées en une seule injection en APCI avec un simple quadripôle. En 2002, les ESP munis de triples quadripôles étaient capables de quantifier jusqu'à 50 molécules de l'ordre de 10-50 µg/kg. Quelques années plus tard, grâce au QuEChERS, les méthodes multirésidus utilisant les couplages CPG/ SM^n et CLHP/ SM^n permettent aujourd'hui l'analyse qualitative et quantitative en *one shot* de centaines de pesticides de l'ordre de 10 µg/kg dans des matrices très complexes (Sinha *et al.* 2012 [219], Camino-sanchez *et al.* 2011 [229]). La plus performante fait état de 660 pesticides analysés dans des tissus animaux par CPG/ SM et CLHP/ SM tandem (Pang *et al.* 2006 [230]) ! Une grande diversité de pesticides sont analysés par CLHP/ SM^n : les

herbicides phénoxyacides, les phénylurées, les sulfonyl urées, les carbamates, les pyréthriinoïdes, les azoles et un grand nombre de dithiocarbamates (Raina 2011 [217]), les organophosphorés, les fongicides dérivés du benzimidazole, les herbicides chlorés, les insecticides neonicotinoïdes, les dérivés des carbamates, de la simazine et de la tertbutylazine (Cserhati et Szogyi 2012 [213])... Le couplage de masse tandem (trappe d'ions et triples quadrupôles) est également une réponse aux effets matrice inhérents aux analyses de traces (voir § 5. 3.), en parvenant à une sensibilité et une sélectivité élevées (Hajslova et Zrostlikova 2003 [221]).

Notons enfin que des systèmes de spectrométrie de masse à pression atmosphériques (DART et DESI) permettent de screener les pesticides directement à la surface des fruits et des légumes et sont à l'étude par la Food and Drug Administration (FDA) aux Etats-Unis (Villaverde *et al.* 2016 [189]).

5. 2. 4. Chromatographie en phase gazeuse vs chromatographie liquide

Depuis les années 60, la CPG a été utilisée pour l'analyse des pesticides, en particulier des molécules thermostables, volatiles ou semi volatiles et plutôt apolaires voire moyennement polaires. Dans le domaine de l'analyse des molécules de phytosanitaires, la CPG a bénéficié du développement des colonnes capillaires (amélioration de la résolution) et des détecteurs sélectifs et sensibles (DCE, DNP, DTI...). Le couplage avec les détecteurs de spectrométrie de masse a permis de gagner en sensibilité et en spécificité. Mais de nos jours, les industries phytochimiques, devant l'urgence de mettre sur le marché des produits de plus en plus efficaces et ciblés et de moins en moins rémanents, développent des molécules plus polaires, moins volatiles et donc peu thermolabiles (limiter la volatilisation et les transferts dans l'environnement, la bioaccumulation). Ces molécules ne sont pas de bons candidats pour une analyse par CPG sans dérivatisation préalable (Villaverde *et al.* 2016 [189], El Mrabet 2008 [218]). Aujourd'hui, environ 60 % des pesticides et de leurs métabolites sont analysables par CPG. Il est possible de dérivatiser les molécules (N-méthylcarbamates, urées, chlorophénoxyacides...) pour les rendre plus thermolabiles et analysables en phase gazeuse. Mais en général, cette étape supplémentaire est considérée comme fastidieuse et génératrice d'erreurs (perte d'analyte donc perte de sensibilité, sélectivité).

De plus en plus, la chromatographie liquide est utilisée pour l'analyse des nouvelles molécules de phytosanitaires. Par ailleurs, la méthode QuEChERS a été idéalement conçue pour une injection directe en phase liquide puisque l'extrait se trouve déjà dans l'acétonitrile (Cf. § 5. 1. 3.). Les extraits de phytosanitaires sont souvent stabilisés par de l'acide formique pour éviter leur dégradation. Les extraits QuEChERS lorsqu'ils doivent être analysés en CPG sont généralement évaporés à sec pour être repris dans un solvant plus compatible (acétate d'éthyle, hexane, iso-octane...). En chromatographie liquide, les phases inverses sont particulièrement efficaces pour la séparation des pesticides offrant un large spectre de polarités.

A l'heure actuelle, de nombreux phytosanitaires sont analysés aussi bien en CPG qu'en CLHP : des organophosphorés, des pyréthriinoïdes, des carbamates, des triazines, des chloroacétanilides, des herbicides phénoxyacides et des azoles (Raina 2011 [217]). Mais aujourd'hui le couplage CLHP/SM est utilisée comme méthode de référence lorsqu'il s'agit de comparer de nouvelles méthodes, basées sur d'autres techniques analytiques (Plonka *et al.* 2016 [212]). Notons que la majorité des composés sont quantifiables par CLHP/SM avec des LQ de l'ordre de 0,1-1,0 µg/mL, tandis qu'en CPG/SM, les LQ montent à 100 µg/L (El Mrabet 2008 [218]).

Pour conclure, il faut cependant relever que l'ionisation des molécules en phase liquide dépend de nombreux facteurs et est particulièrement lié à la nature des phases mobiles, alors qu'en phase gazeuse, l'ionisation est plus efficace et la détectabilité peut être par conséquent meilleure. Le Tableau I-25 donne quelques exemples de LD et LQ obtenues pour divers pesticides dans des matrices alimentaires analysés soit par CPG, soit par CLHP.

Matrice	Pesticides	Extraction	Méthode analytique	LD	LQ
Fruits, légumes, sols	kresoxime-méthyl, boscalid	Solvants + NaCl	CPG/SM(SIM) CPG/DCE	0,006 mg/kg 0,015 mg/kg 0,04 ng/kg 0,06 ng/kg	0,02 mg/kg 0,05 mg/kg 0,014 mg/kg 0,02 mg/kg
Peaux de bananes	Insecticides organophosphorés (chlorpyrifos, malathion...)	QuEChERS modifié	CPG/DNP	0,002-0,064 mg/kg	-
Fruits, baby food	Organochlorés	QuEChERS	CPG/SM	-	0,001-0,013 mg/kg
Jus de poires	Cyperméthrine et perméthrine	MicroELL dispersive assistée par US	CPD/DIF GC/MS(IC+)	2,2-3,1 µg/kg < 10 µg/kg	- -
Raisins	Multirésidus	Acétonitrile + sels +dSPE (PSA)	GC/MS(SIM)	0,0017-0,2667 mg/kg	-
Miel	Chlorpyrifos et pyréthriinoïdes	ELL et SPE (florisil)	CPG/DCE	0,016 mg/kg	0,032 mg/kg
Cires d'abeille	Acaricides	-	CPG/DCE CPG/DNP CPG/MS	- - -	0,1-0,3 mg/kg 0,1-0,3mg/kg 12-85 µg/kg
Pommes de terre, sols	Metribuzine, quizalofop-p-ethyl	Solvants et SPE (Florisil)	CPG/DCE	-	0,01mg/kg
Thé	Pesticides	SPME (SWCNT)	CPG/SM	0,027-0,23 ng/mL	-
Thé	22 pesticides	QuEChERS	CPG/SM ² trappe d'ion	< LMR de l'EU et du Japon	-
Condiment	Organochlorés et pyréthriinoïdes	Acétonitrile et perméation de gel + SPE (Florisil+PSA)	CPG/µDCE	0,082-2,3 g/kg	1,5-13 g/kg
Laits	Organochlorés	-	CPG/DCE	0,11 mg/kg	-
Nourriture pour poissons	Organochlorés	ELL et SPE (Si)	CPG/SM ² (triple quad)	0,01-0,11 mg/L	0,02-0,35 mg/L
Nourriture pour poissons	17 pesticides	MAE et SPE (GCB+Florisil)	CPG/SM ²	0,3-23,1 ng/kg	2,3-76,9 ng/kg
Produits transformés	Pesticides	Solvant + Na ₂ SO ₄	CPG/SM	< 0,01 mg/kg	-
Feuilles de thé	Pesticides	Extraction + dSPE	CPG/SM(IC-) UCLHP/SM	< 1 µg/kg 10 µg/kg	- -
Fruits et légumes	54 pesticides	Acétonitrile + NaCl	CLHP/SM ² (triple quad en mode SRM)	0,03-14,9 µg/kg	-
Courgettes et ses feuilles	Acétamipride	Eau/méthanol et l'hexane	ELL à CLHP/MS ² (ESP)	0,01 mg/kg 0,02 mg/kg	0,03 mg/kg 0,06 mg/kg
Riz	8 pesticides	MSPD sur alumine neutre par acétonitrile	CLHP/UV	0,002-0,200 mg/kg	0,006-0,600 mg/kg
Riz	104 pesticides	Acétonitrile et dSPE (GCB+PSA+ODS) ou MSPD	CLHP/MS ²	< 10 mg/kg pour 89% des pesticides	-
Huile d'olive	Simazine Terbutylazine	ELL et MSPD sur aminopropyle	CLHP/UV	0,0127 mg/kg 0,027 mg/kg	0,0540 mg/kg 0,14 mg/kg
Thé	Pyréthriines	ELL (acétonitrile) et SPE multicouche	UPLC/MS ² (ESP+)	0,009 mg/kg	< 0,03 mg/kg
Oignons	Pesticides	MSPD sur ODS par acétonitrile	CLHP/SM ² (ESP)	0,003-0,030 mg/kg	0,01-0,10 mg/kg
Herbes médicinales chinoises	74 pesticides et leurs métabolites	ASE et perméatio de gel + SPE (GCB+PSA)	CLHP/SM	< 0,01 mg/kg	-

Tableau I-25 : Comparaison CPG vs CLHP et nature des détecteurs d'après Cserhati et Szogyi 2012 [213]

5. 2. 5. La chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince (CCM) et la chromatographie sur couche mince haute performance (CCMHP) sont les plus anciennes techniques de chromatographie. Elles sont mises en œuvre pour le screening des métabolites dans les extraits végétaux, matrices généralement très complexes. Il est intéressant de noter que la CCMHP est à l'origine du développement des méthodes multirésidus, lorsque la détection directe sur la plaque a été découvert, par l'exploitation de l'activité

biologique des pesticides (inhibition de la cholinestérase, spores de champignons...) (Sobhandazeh *et al.* 2014 [176]).

La littérature a montré que ces techniques étaient en tout point équivalentes aux techniques de routines appliquées dans l'analyse des pesticides (CPG-DCE, CLHP-UV, ELISA), à cela près qu'elles sont plus rapides, plus simples à mettre en œuvre et plus économiques. Elles restent d'actualité pour l'identification des molécules actives dans les formulations commerciales de produits phytosanitaires. Par ailleurs, elles sont très flexibles : peu de purification des échantillons, multiplicité des phases mobiles, grandes capacités de charge (Plonka *et al.* 2016 [212]).

La CCMHP a tendance à émerger de nouveau car elle peut être couplée maintenant avec divers détecteurs comme la spectrométrie de masse grâce à une interface automatisée qui rend l'analyse quantitative facilement accessible (Cf. § 5. 1. 2.) (Oellig et Schwack 2011 [197]).

5. 3. Les effets matrice

Les effets matrice sont inhérents au dosage des résidus phytosanitaires dans les matrices complexes que sont les denrées alimentaires. Ils ont fait l'objet de nombreuses études accessibles dans la littérature.

5. 3. 1 Généralités

Le couplage avec la spectrométrie de masse, et en particulier avec la SM/SM, a amélioré significativement la sélectivité pour les analyses des drogues et de leurs métabolites dans les fluides biologiques et les analyses de traces dans les matrices complexes. La conséquence a été la simplification des méthodes de préparation et/ou de séparation. En parallèle, des différences significatives au niveau des intensités des pics chromatographiques ont été observées entre les solutions pures et les extraits biologiques à concentrations identiques. Dans la plupart des cas, le signal est réduit. Les analytes co-extraits influencent la réponse des détecteurs et en particulier l'ionisation des analytes d'intérêt. L'effet matrice a été défini au cours du workshop tenu à Arlington, en Janvier 2000, et intitulé « *Bioanalytical Method Validation – A Revisit with a Decade of Progress* ». Silvestro *et al.* en 2013 [231] décrit ce phénomène comme une « altération directe ou indirecte ou d'une interférence dans la réponse relative à la présence d'analytes non prévus (pour l'analyse) ou d'autres substances interférentes dans l'échantillon ». Les effets matrice sont aujourd'hui largement connus et les différences de matrices entre des échantillons du même genre retiennent toute l'attention. Les validations de méthodes doivent assurer que les données quantitatives et qualitatives obtenues sont correctes (Silvestro *et al.* 2013 [231]).

L'effet matrice EM est calculé à partir de l'équation (8) :

$$EM (\%) = (A_{\text{solvant}} / A_{\text{matrice}}) \times 100 \quad (8)$$

où A_{solvant} : aire du pic du standard dans le solvant

A_{matrice} : aire du pic dans l'extrait matrice

Les effets matrices ne conduisent pas systématiquement à une diminution de l'aire des signaux, ils peuvent aussi entraîner une augmentation de l'aire. La valeur du facteur matrice FM, caractérisé par l'équation (9) donne une indication sur la nature de l'effet matrice :

$$FM = RP_{\text{matrice}} / RP_{\text{solvant}} \quad (9)$$

où RP_{matrice} : réponse du pic en présence des ions matrices
 RP_{solvant} : réponse du pic dans le solvant

- FM = 1 : pas d'effet matrice,
- FM < 1 : suppression d'ions,
- FM > 1 : augmentation d'ions.

Les effets matrice sont différents selon la nature des échantillons mais ils existent aussi au sein de différents lots d'échantillons de même nature. Matuszewski *et al.* ont identifié ce phénomène sous le nom d'« effet matrice relatif », comme étant la variation de l'effet matrice absolue, défini par l'équation (8) et calculé pour différents lots issus de la même matrice endogène (Silvestro *et al.* 2013 [231]).

5. 3. 2. Les effets matrice en chromatographie en phase gazeuse

En CPG, Erney *et al.* en 1993 ont les premiers identifié l'effet d'augmentation d'ions sous le terme de « réponse chromatographique induite par la matrice » alors qu'ils analysaient des phytosanitaires organophosphorés dans des extraits de lait et de beurre. Leur théorie explique que lors de l'injection des standards en milieu solvant, les analytes peuvent d'adsorber et/ou se dégrader (thermo-décomposition catalytique) sur les sites actifs de l'injecteur et de la colonne (métaux et silanols libres à la surface des liners en verre). En présence de matrice, les composés de la matrice viennent bloquer les mêmes sites actifs, provoquant une augmentation de la réponse des standards (Figure I-54). L'effet matrice est donc la conséquence de la quantité de composés co-extraits de la matrice qui est généralement plus importante que celle des analytes d'intérêt. Par conséquent, plus la concentration de l'analyte est faible (ultra-traces), plus l'effet matrice positif est important. Dans ces conditions, une surestimation des données quantitatives est à craindre si les courbes d'étalonnage ne sont pas préparées dans les extraits de matrice. En parallèle, le nombre de nouveaux sites actifs augmentent par accumulation progressive de composés non volatils de la matrice au niveau du liner d'injection et du front de colonne. Cela peut se traduire par une diminution de la réponse qu'Haslova et Cajka [232] ont décrit en 2008 comme « un effet de diminution induit par la matrice ». Ces deux phénomènes interviennent presque simultanément et il est quasiment impossible de contrôler la formation des nouveaux sites actifs par l'accumulation des analytes non volatils.

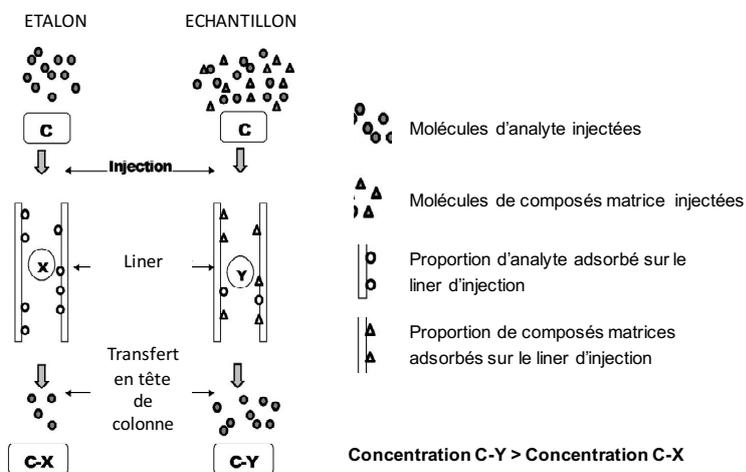


Figure I-54 : Illustration de l'effet matrice positif en CPG d'après Hajslova et Zrostlikova 2003 [221]

Dans le couplage CPG/SM, les effets matrice sont souvent éludés car la chromatographie en phase gazeuse demande une préparation d'échantillons plus importante que celle en phase liquide. Cependant, ils sont loin d'être systématiquement négligeables. Contrairement à l'ionisation de la CLHP/MS, en CPG/SM, l'énergie est telle qu'il n'y a plus de compétition d'ionisation entre les espèces. Par conséquent, les causes de l'effet matrice en CPG sont plus liés à l'injecteur et la colonne chromatographique (Silvestro *et al.* 2013 [231]). Cependant, pour Haslova *et al.*, le détecteur reste une source non négligeable des effets matrice sur la base de la co-élution d'un analyte d'intérêt avec un composé volatil de temps de rétention identique, pouvant alors entraîner (Hajslova et Zrostilkova 2003 [221]):

- un faux négatif,
- un faux positif si l'impureté est confondue avec l'analyte qui est en réalité absent,
- une augmentation du signal qui conduit à une surestimation,
- une extinction du signal qui conduit à une sous-estimation (surtout dans le cas des détecteurs FPD).

Dans les deux premiers cas, il n'y a pas de solution envisageable si ce n'est de pouvoir corrélérer avec une autre méthode analytique, mais concernant les deux derniers, ils peuvent se régler grâce à un étalonnage adapté.

De Sousa *et al.* en 2012 [233] ont mis en évidence des effets matrice positifs et négatifs pour des phytosanitaires (Isophtalonitrile, organophosphorés, néonicotinoïdes, dicarboximides, chlorocyclodiène, pyréthrinoïdes, strobilurine) analysés par CPG/DCE dans des échantillons de sol (A), pomme de terre (B), eau (C), pomme (D), ananas (E), raisin (F) et tomate (G) (Figure I-55).

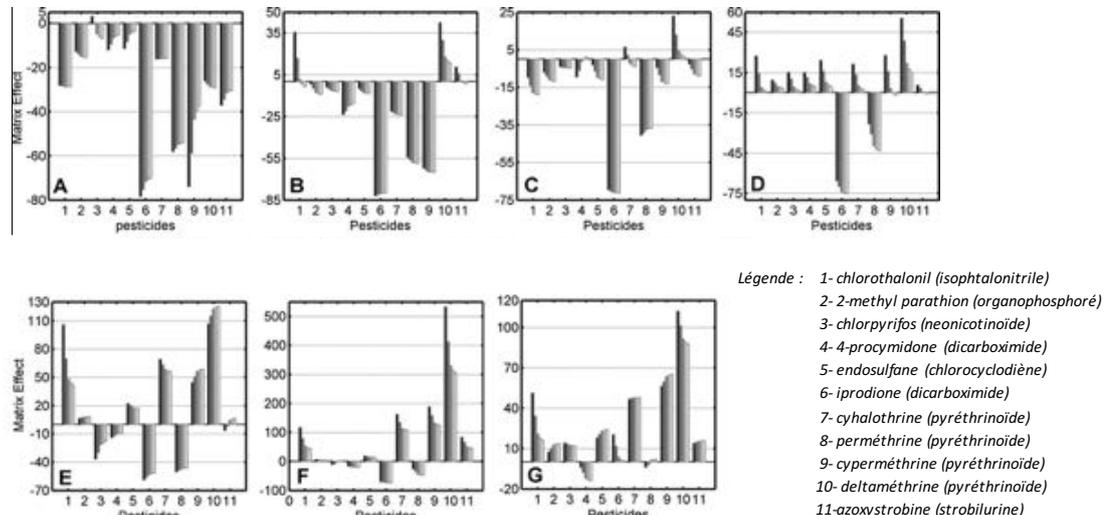


Figure I-55 : Effets matrice mesurés dans différents échantillons de sol (A), de pomme de terre (B), d'eau (C), de pomme (D), d'ananas (E), de raisin (F) et de tomate (G) d'après De Sousa *et al.* 2012 [233]

Les détecteurs de masse étant beaucoup plus spécifiques, les effets matrice sont moindres même si dans certains cas, il n'est pas possible de confirmer l'identité de l'analyte (simple quadrupôle et trappe d'ions). Cet inconvénient se vérifie particulièrement avec des ions non spécifiques de masses faibles ($m/z < 100$).

Les composés matrice susceptibles de provoquer des effets positifs en CPG sont les lipides (cires, triglycérides, phospholipides...), les pigments (chlorophylles, caroténoïdes, mélanoidines...) et

d'autres molécules de masse élevée (résines...) qui se solubilisent généralement avec les solvants d'extraction des analytes d'intérêt. La traînée et la disparition des pics d'intérêt sont le signe d'un détecteur encrassé.

Les groupements les plus sensibles aux effets matrices positifs sont les organophosphates (-P=O) tels que le chlorpyrifos, le dichlorvos, le parathion, le pirimiphos..., les carbamates (-O-CO-NH-) tels que le pirimicarb, le carbaryl, le dimépipérate..., les composés hydroxylés (-OH), les carboxyles (-COOH), les composés aminés (-NH-), les azoles, imidazoles et benzimidazoles (-N=) tels que fenbuconazole, tébuconazole..., les dérivés de l'urée (-NH-CO-NH-), les organochlorés tels que le dicofol, le captane..., les pyréthriinoïdes tels que la deltaméthrine, le tau-fluvalinate..., les dinitroanilines, les amides, les acides phénoxyacétiques... Les molécules hydrophobes apolaires tels que les organochlorés persistants sont peu sujets à des augmentations de signal car ils s'adsorbent moins à la surface des liners (Wang *et al.* 2011 [234]).

Il existe plusieurs solutions pour limiter les effets matrice en CPG : purification poussée des échantillons (les échantillons très sales ou très chargés (séparations faibles) sont un véritable problème), addition d'étalons internes deutérés (Kwon *et al.* 2012 [235]), calibration par ajouts dosés, calibration dans la matrice (Wang *et al.* 2011 [234], Andrade *et al.* 2011 [236]), ajout de protectants (sorbitol, acide gulonique- γ -lactone...)... Les protectants sont ajoutés dans les étalons et les échantillons : ils interagissent fortement avec les sites actifs (essentiellement les silanols) du système et minimisent ainsi les effets matrices (Wang *et al.* 2011 [234], Kwon *et al.* 2012 [235]). La maintenance des consommables (changement des liners et des pré-colonnes) et du spectromètre de masse (nettoyage de la source) doit avoir lieu régulièrement de façon à préserver la sensibilité et la reproductibilité de la méthode CPG/SM (Wang *et al.* 2011 [234]). La CPG bi-dimensionnelle apporte une réelle innovation dans la séparation des molécules actives avec les composés matrices (Figure I-56).

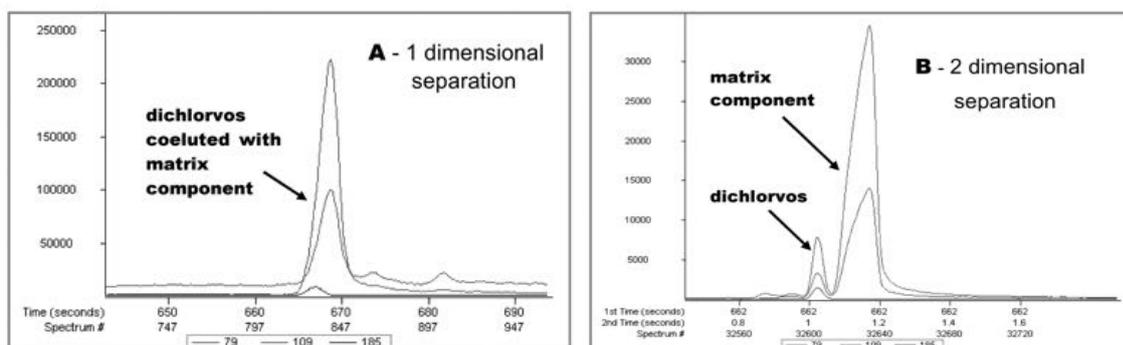


Figure I-56 : Séparation du dichlorvos et de la matrice pommes d'après Hajslova et Zrostlikova 2003 [221]

5. 3. 3. Les effets matrices en chromatographie liquide

En chromatographie liquide, la composition du liquide (phase mobile – tampons... et quantités de composés co-extraits de la matrice) qui entre dans le détecteur joue un rôle déterminant. En mode ESP en particulier, la vitesse d'émission des ions à partir d'une gouttelette est proportionnelle au nombre de charges et sera d'autant plus élevée que les propriétés de surface de l'ion seront importantes (Silvestro *et al.* 2013 [231]). Les composés matrice interférents entrent ici en compétition : c'est l'effet de suppression des ions décrit pour la première fois dans les années 90 par

Kebarle *et al.* En général, les effets matrice sont plus importants en début de chromatogramme, là où s'éluent les composés les plus polaires des matrices, non retenus par les colonnes en phase inverse. Les phospholipides et les glycérophosphocholines sont les principaux responsables des effets matrice dans les échantillons biologiques et le plasma respectivement.

Dans les autres méthodes d'ionisation (APCI...), les mécanismes étant différents, l'effet matrice existe dans une autre proportion.

De nombreuses stratégies sont proposées pour diminuer les effets matrice positifs et négatifs dans l'analyse des traces en CLHP/SM : optimiser la préparation de l'échantillon, diminuer les volumes injectés, améliorer les séparations en faisant appel à la chromatographie bi-dimensionnelle, modifier la phase mobile, adapter la méthode de calibration (calibration dans les extraits matrice, utilisation d'un étalon interne), ajout en post-colonne d'un étalon de structure identique à l'analyte cible, injection quasi-simultanée de l'échantillon et de la solution standard (technique de l'écho de pic) (Hajslova et Zrostlikova 2003 [221]).

6. Conclusion

Dans la catégorie des fruits à pépins, la pomme, *Malus domestica*, est un cas particulier : il s'agit d'un fruit complexe, ou faux fruit, dans lequel ce n'est pas l'ovaire de la fleur qui se développe pour former le fruit, mais le réceptacle. Pour cette raison, la chair du fruit porte le nom de réceptacle charnu et sa peau, d'épiderme.

La pomme contient jusqu'à 90 % d'eau, 8-12 % de glucides, 3-5 % de protéines et 2 % de fibres (polysaccharides pariétaux dont pectines + lignines) constituant les parois cellulaires, 0,6 % d'acides organiques et 0,3 % de lipides. Les lipides se concentrent à hauteur de 30 % dans l'épiderme dit cutinisé.

En effet, les cellules épidermiques sont recouvertes d'une couche protectrice appelée cuticule et exclusivement constituée de lipides solubles, les cires cuticulaires et insolubles, la cutine. D'un point de vue structural, l'organisation exacte de la cuticule n'est pas totalement élucidée. La couche la plus externe est composée des cires épicuticulaires qui jouent un rôle barrière avec le milieu extérieur (lutte contre les pertes hydriques, protection contre les agresseurs, transport de molécules bioactives telles que xénobiotiques, phytosanitaires...). Elle protège ainsi la cuticule propre représentée par le polymère de cutine imprégné des cires intracuticulaires. Plus on se rapproche des cellules épidermiques et plus la matrice s'enrichit en polysaccharides pariétaux (cellulose, hémicellulose et pectines).

La cuticule représente la voie de diffusion apolaire qui gère le transport des petits analytes polaires non chargés tels que l'eau et des analytes lipophiles jusqu'à 1000 Da tels que les phytosanitaires.

Quant aux polysaccharides, ils caractérisent les parois cellulaires du compartiment de sorption (épiderme) et jouent un rôle essentiel dans la désorption des molécules bioactives.

Sur le plan biochimique, on trouve dans l'épiderme des pommes, des polyphénols (flavonols < 0,5 % et flavanols 44-88 % des polyphénols totaux) et des triterpénoïdes pentacycliques, composants des cires cuticulaires. Au sein des triterpénoïdes pentacycliques, les ursanes (uvaol, acide ursolique...), les oléananes (acide oléanolique...) et les lupanes présentent, au même titre que les polyphénols, de

nombreuses propriétés biologiques (anti-inflammatoires non stéroïdiens, antioxydants, antimicrobiens, antimytotiques, hépatoprotecteurs, hémolytiques...).

Dans l'épiderme, les quantités de polyphénols totaux représentent en moyenne 6 mg équivalent d'acide gallique par gramme de matière humide dans les variétés Gala, Fuji et Pink.

L'acide ursolique est le composé cyclique majoritaire des cires des pommes et représente jusqu'à 60% de la composition massique des cires (variétés Bramley, Cox et Worcester). La pomme est une source non négligeable d'acide ursolique.

Cependant, à côté de ces molécules à haute valeur ajoutée qui peuvent s'inscrire dans un concept de bioraffinage, on trouve des molécules phytosanitaires dont l'utilité est de protéger le fruit depuis son développement sur l'arbre jusque dans l'assiette du consommateur. Après leur transport dans l'épiderme, les molécules de phytosanitaires subissent des dégradations (hydrolyse et photolyse *in situ* catalysées par la présence d'enzymes ou de bactéries) ou des changements d'état (vaporisation depuis le végétal vers l'atmosphère), qui résultent en une forte diminution des concentrations résiduelles au niveau du verger. Les teneurs en résidus phytosanitaires quantifiées dans les matrices pommes sont en France généralement bien inférieures aux limites maximales autorisées (LMR) imposées par la Communauté Européenne. Ces LMR sont variables selon la nature des phytosanitaires et de la matrice sur laquelle ils sont appliqués et dépendent du risque potentiel pour l'homme et l'environnement. En 2016, pour les pommes, les LMR des phytosanitaires appliqués sont comprises entre 0,01 et 5 mg/kg de fruits frais.

Face à des niveaux de contamination extrêmement bas, la technologie à la base du développement des méthodes analytiques mises en œuvre pour identifier et quantifier les résidus a évolué de façon significative, afin d'atteindre des limites de détection (LD) et de quantification (LQ) très basses, de l'ordre de quelques microgrammes par kilogramme et dans de rares cas inférieures au nanogramme par kilogramme. Les résidus phytosanitaires dans les matrices alimentaires à base de fruits et légumes sont classiquement extraits par la méthode QuEChERS normalisée au niveau international (AOAC) et européen (CEN). Actuellement, il s'agit de la méthode la plus efficace dans la mesure où elle permet d'extraire une large gamme de molécules (polaires et apolaires) avec des taux de recouvrement acceptables compris entre 70 et 120 % (coefficient de variation < 20 %), tout en minimisant les pertes des molécules les plus polaires. Les chromatographies en phase gazeuse (CPG) et liquide haute performance (CLHP), couplées à la spectrométrie de masse (SM) et de masse tandem (SMⁿ) sont les techniques les plus répandues. Le développement important de la spectrométrie de masse (triple quadrupôle, TOF, trappe d'ions) a révolutionné l'analyse des résidus : gain de sélectivité, gain du ratio signal/bruit, diminution des effets matrices, des LD et des LQ. Il marque le début de l'analyse multirésidus, dans laquelle plus de 100 et jusqu'à 660 analytes peuvent être analysés en une seule injection. Cependant, les effets matrices restent inhérents aux dosages des résidus phytosanitaires dans les matrices alimentaires. Ce sont des matrices particulièrement complexes : lipides, acides, sucres, pigments... dont les concentrations sont beaucoup plus élevées que celles des analytes traces à doser (traces). Plus la quantité d'analyte est faible (ultratraces), plus les effets matrice sont marqués. Ces interférants matrices présentent souvent, comme dans le cas des lipides, des coefficients de partage octanol/eau ($\log K_{O/E}$) du même ordre de grandeur que ceux des phytosanitaires apolaires et peuvent être en forte interaction avec ces derniers. Dès lors, l'étape de purification des extraits est primordiale afin de minimiser la quantité et la concentration des interférants.

Même si les produits phytosanitaires de traitement sont inhérents aux pratiques agricoles des 50 dernières années, la tendance actuelle, depuis le Grenelle de l'Environnement, revoit leur recours à la baisse. Le Plan EcoPhyto, initié en 2008, a pour objectif de diminuer de 50 % l'usage des phytosanitaires en France d'ici à 2025. Même si la transformation des produits agricoles conduit à une diminution significative voire à une élimination des résidus, dans le cas des produits non transformés, les niveaux de contamination sont scrupuleusement évalués et sont devenus un vrai enjeu économique et de santé publique.

Dans le cas des pommes, troisième fruit le plus consommé dans le monde en 2015, peut-on produire des fruits avec zéro résidu détectable, tout en maintenant le même taux de productivité ? En se basant sur ce travail bibliographique, cette question soulève de nombreuses interrogations fondamentales (verrous scientifiques et technologiques) :

- Comment se structure l'épiderme des pommes ? Où la molécule de phytosanitaire se loge-t-elle une fois qu'elle a pénétré la cuticule ? Quelles sont les interactions composés(s) matrice / phytosanitaire à la base de la rétention ?
- Quel est le rôle des composants majoritaires de la cuticule : cires dont les acides terpéniques, cutine ?
- Comment faire pénétrer un agent chimique d'extraction dans l'épiderme ? Comment le faire interagir avec la molécule de phytosanitaire ? Comment extraire le complexe agent – phytosanitaire et quelles propriétés doit-il présenter ?
- Avec quels outils peut-on modéliser les phénomènes de transport de matière depuis l'extérieur dans la cuticule et inversement ?
- Quelle stratégie (agents chimiques, outils, méthodologie) peut-on mettre en œuvre pour identifier et développer un procédé à l'échelle industrielle à l'issue duquel il sera possible d'extraire les résidus des pommes et de proposer un fruit à zéro résidu détectable ?

Afin de répondre à ces questions scientifiques et lever les verrous technologiques, nous articulons le travail de thèse en trois parties :

- 1- Etude de la composition des épidermes de pommes et de la structure des lipides cuticulaires. Mise en évidence des propriétés cristallines et amorphes des cires et des cuticules. Interactions molécule active – cuticule,
- 2- Etudes des effets matrice dans des extraits QuECHERS de pommes,
- 3- Etude des interactions plastifiants – phytosanitaires – cuticules. Mise au point d'un procédé industriel de décontamination des pommes avant commercialisation.

Trois variétés de pommes les plus représentatives des vergers du Sud-Ouest de la France et des goûts des consommateurs, ainsi qu'une douzaine de résidus phytosanitaires identifiés parmi les plus utilisés (Tableau I-10) dans les vergers sus-cités ont été sélectionnés pour nos travaux de thèse.

Références bibliographiques

- [1] Le Portail de l'Agroalimentaire Français à l'Export, Fiche technique sur la pomme française, France Agroalimentaire (2015). <http://www.franceagroalimentaire.com/actualite-agro/fiche-technique-sur-la-pomme-francaise/> (consulté le 30 Janvier 2016).
- [2] RNM - Centre d'Angers, La pomme en 2014-2015 - Bilan de campagne, France AgriMer. https://www.rnm.franceagrimer.fr/bilan/pomme_rnm.pdf (consulté le 30 Janvier 2016).
- [3] L. Guiavarch, Les exportations de pommes en 2014-2015 (2015). https://www.rnm.franceagrimer.fr/bilan/pommexport_rnm.pdf (consulté le 30 Janvier 2016).
- [4] Agreste Alimentation - Memento 2011 (2011). http://agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf_alim2011.pdf (consulté le 30 Janvier 2016).
- [5] Le Grand Inventaire du Vivant en Europe : Planche 8 - La Pomme, Ed. du Gulf Stream, Collection Sauvegarde (2003).
- [6] Chambre d'Agriculture Languedoc-Roussillon Midi-Pyrénées, Cerfrance, L'arboriculture (2016). http://www.lrmp.chambagri.fr/uploads/media/agricopie2016_arboriculturep22.pdf (consulté le 30 Janvier 2016).
- [7] Agreste, Exploitations arboricoles et vergers - Recensement agricole 2010 - Les noyers sont désormais le deuxième verger français, Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt (2012). http://agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf_primeur277.pdf (consulté le 30 Janvier 2016).
- [8] Agreste, Midi-Pyrénées : modernisation du verger de pommiers (2008). <http://agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/R7308A04.pdf> (consulté le 30 Janvier 2016).
- [9] S. Ziadi, Les gènes PR-10 du pommier (*Malus domestica*) : identification, caractérisation et analyse de l'expression spatio-temporelle en réponse à une induction par l'acibenzolar-S-méthyl (ASM), un analogue fonctionnel de l'acide salicylique, thèse de doctorat, Université de Rennes 1 (2001).
- [10] A.L. Van, Potentiel évolutif du pouvoir pathogène de *Venturia inaequalis* en lien avec la domestication du pommier et l'utilisation de résistances quantitatives en amélioration variétale, thèse de doctorat, Université d'Angers (2011). <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00663827/document> (consulté le 19 Juillet 2016).
- [11] J.P. Robinson, S.A. Harris, B.E. Juniper, Taxonomy of the genus *Malus* Mill. (*Rosaceae*) with emphasis on the cultivated apple, *Malus domestica* Borkh., Plant Syst. Evol. 226 (2001) 35–58. doi:10.1007/s006060170072.
- [12] N.I. Vavilov, Wild progenitors of the fruit trees of Turkistan and the Caucasus and the problem of the origin of fruit trees, in: Proceedings of the 9th International Horticultural Congress, London (1930) 271–86.
- [13] R. Velasco, A. Zharkikh, J. Affourtit, A. Dhingra, A. Cestaro, A. Kalyanaraman, P. Fontana, S.K. Bhatnagar, M. Troggio, D. Pruss, S. Salvi, M. Pindo, P. Baldi, S. Castelletti, M. Cavaiuolo, G. Coppola, F. Costa, V. Cova, A. Dal Ri, V. Goremykin, M. Komjanc, S. Longhi, P. Magnago, G. Malacarne, M.

Malnoy, D. Micheletti, M. Moretto, M. Perazzolli, A. Si-Ammour, S. Vezzulli, E. Zini, G. Eldredge, L.M. Fitzgerald, N. Gutin, J. Lanchbury, T. Macalma, J.T. Mitchell, J. Reid, B. Wardell, C. Kodira, Z. Chen, B. Desany, F. Niazi, M. Palmer, T. Koepke, D. Jiwan, S. Schaeffer, V. Krishnan, C. Wu, V.T. Chu, S.T. King, J. Vick, Q. Tao, A. Mraz, A. Stormo, K. Stormo, R. Bogden, D. Ederle, A. Stella, A. Vecchiatti, M.M. Kater, S. Masiero, P. Lasserre, Y. Lespinasse, A.C. Allan, V. Bus, D. Chagne, R.N. Crowhurst, A.P. Gleave, E. Lavezzo, J.A. Fawcett, S. Proost, P. Rouze, L. Sterck, S. Toppo, B. Lazzari, R.P. Hellens, C.-E. Durel, A. Gutin, R.E. Bumgarner, S.E. Gardiner, M. Skolnick, M. Egholm, Y. Van de Peer, F. Salamini, R. Viola, The genome of the domesticated apple (*Malus x domestica* Borkh.), *Nat. Genet.* 42 (2010) 833–841.

[14] J.A. Fawcett, S. Maere, Y.V. de Peer, Plants with double genomes might have had a better chance to survive the Cretaceous–Tertiary extinction event, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106 (2009) 5737–5742. doi:10.1073/pnas.0900906106.

[15] D. Potter, T. Eriksson, R.C. Evans, S. Oh, J.E.E. Smedmark, D.R. Morgan, M. Kerr, K.R. Robertson, M. Arsenault, T.A. Dickinson, C.S. Campbell, Phylogeny and classification of *Rosaceae*, *Plant Syst. Evol.* 266 (2007) 5–43. doi:10.1007/s00606-007-0539-9.

[16] R. Prat, Fruits et Légumes du marché : la pomme, Biologie et Multimédia, Université Pierre et Marie Curie, UFR des Sciences de la Vie (2010). <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Marche/pomme.htm>. (consulté le 30 Janvier 2016).

[17] B.G. Bowes, Mauseth, *Structure des plantes*, 2e édition, Quae (2012). ISBN 978-2-7592-1688-8.

[18] M. Colin-Henrion, De la pomme à la pomme transformée : impact du procédé sur deux composés d'intérêt nutritionnel. Caractérisation physique et sensorielle des produits transformés, thèse de doctorat, Université d'Angers (2008).

[19] E. Laville, *La protection des fruits tropicaux après récolte* (1994). <http://agritrop.cirad.fr/312494/> (consulté le 19 Juillet 2016).

[20] N.A. Campbell, J.B. Reece, R. Mathieu, *Biologie*, 2e édition revue et corrigée, De Boeck (2004).

[21] M. Simon, *Les parois végétales*, (2009). <http://www.cours-pharmacie.com/biologie-vegetale/les-parois-vegetales.html> (consulté le 30 Janvier 2016).

[22] P. Massiot, A. Baron, J.F. Drilleau, Characterisation and enzymatic hydrolysis of cell-wall polysaccharides from different tissue zones of apple, *Carbohydr. Polym.* 25 (1994) 145–154. doi:10.1016/0144-8617(94)90198-8.

[23] D. Kpogbemabou, Procédé de fabrication de biocarburants à partir de biomasse lignocellulosique biologiquement déstructurée, thèse de doctorat, Université de Poitiers (2011).

[24] G. Campeanu, G. Neata, G. Darjanschi, Chemical Composition of the Fruits of Several Apple Cultivars Growth as Biological Crop, *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca.* 37 (2009) 161–164.

[25] J. Wu, H. Gao, L. Zhao, X. Liao, F. Chen, Z. Wang, X. Hu, Chemical compositional

characterization of some apple cultivars, *Food Chem.* 103 (2007) 88–93.

[26] P. Massiot, C.M.G.C. Renard, Composition, Physico-chemical Properties and Enzymatic Degradation of Fibres Prepared from Different Tissues of Apple, *LWT - Food Sci. Technol.* 30 (1997) 800–806. doi:10.1006/fstl.1997.0276.

[27] J.A. Marlett, N.W. Vollendorf, Dietary fiber content and composition of different forms of fruits, *Food Chem.* 51 (1994) 39–44. doi:10.1016/0308-8146(94)90045-0.

[28] S. Bureau, I. Scibisz, C. Le Bourvellec, C.M.G.C. Renard, Effect of Sample Preparation on the Measurement of Sugars, Organic Acids, and Polyphenols in Apple Fruit by Mid-infrared Spectroscopy, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 3551–3563.

[29] C. Verdu, Cartographie génétique des composés phénoliques de la pomme, thèse de doctorat, Université de Nantes Angers Le Mans (2013).

[30] I. Travers, Influence des conditions pédoclimatiques du terroir sur le comportement du pommier et la composition des pommes à cidre dans le Pays d'Auge, thèse de doctorat, Université de Caen (2002).

[31] R. Veberic, M. Trobec, Herbinger, M. Hofer, D. Grill, F. Stampar, Phenolic compounds in some apple (*Malus domestica* Borkh) cultivars of organic and integrated production, *J. Sci. Food Agric.* (2005) 1687–1694.

[32] M.A. Awad, A. de Jager, L.M. van Westing, Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: characterisation of variation, *Sci. Hortic.* 83 (2000) 249–263. doi:10.1016/S0304-4238(99)00124-7.

[33] S. Guyot, N. Marnet, D. Laraba, P. Sanoner, J.-F. Drilleau, Reversed-Phase HPLC following Thiolytic for Quantitative Estimation and Characterization of the Four Main Classes of Phenolic Compounds in Different Tissue Zones of a French Cider Apple Variety (*Malus domestica* Var. Kermerrien), *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 1698–1705. doi:10.1021/jf970832p.

[34] M.A. Tessmer, L.R. Antonioli, B. Appezzato-da-Gloria, Cuticle of “Gala” and “Galaxy” apples cultivars under different environmental conditions, *Braz. Arch. Biol. Technol.* 55 (2012) 709–714.

[35] C. Henriquez, S. Almonacid, I. Chiffelle, T. Valenzuela, M. Araya, L. Cabezas, R. Simpson, H. Speisky, Determination of Antioxidant Capacity, Total Phenolic Content and Mineral Composition of Different Fruit Tissue of Five Apple Cultivars Grown in Chile, *Chil. J. Agric. Res.* 70 (2010) 523–536.

[36] T.K. McGhie, S. Hudault, R.C.M. Lunken, J.T. Christeller, Apple Peels, from Seven Cultivars, Have Lipase-Inhibitory Activity and Contain Numerous Ursenoic Acids As Identified by LC-ESI-QTOF-HRMS, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 482–491.

[37] N. Bonnefoy, Pesticides : vers le risque zéro, Sénat français (2012). <http://www.senat.fr/rap/r12-042-1/r12-042-1.html> (consulté le 30 Janvier 2016).

[38] ORP, Les pesticides - Historique. <http://www.observatoire-pesticides.fr/index.php?pageid=61> (consulté le 30 Janvier 2016).

- [39] LNE, Les pesticides (2008). <http://www.metrologie-francaise.fr/fr/dossiers/pesticides-tracabilite-mesure.pdf> (consulté le 30 Janvier 2016).
- [40] Ecophyto 2018, Ministère de l'Agriculture et de la Pêche (2008). <http://www.observatoire-pesticides.fr/index.php?pageid=662> (consulté le 01 Février 2016).
- [41] Plan Ecophyto II (2015). http://agriculture.gouv.fr/sites/minagri/files/151022_ecophyto.pdf (consulté le 30 Janvier 2016).
- [42] D. Herzfeld, K. Sargent, Pesticide Formulations, in: Priv. Pestic. Appl. Saf. Educ. Man., 19th edition, Virginia Tech, University of Minnesota (2011) 85–108.
- [43] IRAC International MoA Working Group, IRAC Mode of Action Classification Scheme Version 8.1 (2016).
- [44] Les produits phytosanitaires, la santé et l'environnement, Commission européenne, Office des publications officielles des Communautés européennes, Luxembourg (2003) 48p. ISBN 92-894-4430-4
- [45] The Pesticide Manual, sixteenth edition, British Crop Production Council, C. MacBean (2012).
- [46] Accès alphabétique des substances actives. <http://e-phy.agriculture.gouv.fr> (consulté le 30 Janvier 2016).
- [47] Agritox - Base de données sur les substances actives pharmaceutiques. <http://www.agritox.anses.fr/php/fiches.php> (consulté le 30 Janvier 2016).
- [48] Portail substances chimiques. <http://www.ineris.fr/substances/fr/> (consulté le 30 Janvier 2016).
- [49] D. Mackay, W.-Y. Shiu, K.-C. Ma, S.C. Lee, Handbook of Physical-Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals, Second Edition, CRC Press (2006).
- [50] EU Pesticides database. <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=pesticide.residue.selection&language=EN> (consulté le 01 Février 2016).
- [51] N. Brunet, L. Guichard, B. Omon, N. Pingault, N. Pleybert, A. Seiler, L'indicateur de fréquence de traitement (IFT) : un indicateur pour une utilisation durable des pesticides, *Courr. Environ. INRA*. (2008) 131–141.
- [52] J.P. Butault, N. Delame, F. Jacquet, G. Zardet, L'utilisation des pesticides en France : état des lieux et perspectives de réduction, *Ministère Agric. Aliment. Pêche Rural. Aménagement Territ.* (2011) 7–26.
- [53] J.P. Butault, N. Delame, F. Jacquet, P. Rio, G. Zardet, C.A. Dedryver, T. Volay, C. Gary, L. Guichard, M. Pitrat, B. Sauphanor, L'utilisation des pesticides en France : état des lieux et perspectives de réduction, in: *Réduction Pesticides Enjeux Modalités Conséq.*, Lyon, France (2010) 12p.
- [54] Pratiques phytosanitaires en arboriculture - Des traitements phytosanitaires dans les vergers

de pommiers variables selon les bassins de production, Agreste Primeur (2015) 8p.

[55] Partenaires techniques départementaux, Chambre d'Agriculture, Blue Whale, DRAAF/DREAL/DDT, Lycée Agricole, INRA, CTIFL, AEAG, Projet Ecophyto pommes 82 2009-2010, (2009).

[56] K.M. Maguire, Factors affecting mass loss of apples : a thesis presented in partial fulfilment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Plant Science at Massey University, New Zealand, Thesis, Massey University (1998). <http://mro.massey.ac.nz/xmlui/handle/10179/2746> (consulté le 19 Juillet 2016).

[57] W. Schotsmans, B.E. Verlinden, J. Lammertyn, B.M. Nicolai, The relationship between gas transport properties and the histology of apple, J. Sci. Food Agric. 84 (2004) 1131–1140.

[58] A. Konarska, Differences in the Fruit Peel Structures between Two Apple Cultivars During Storage, Acta Sci. Pol.-Hortorum Cultus. 11 (2012) 105–116.

[59] K.J. Lenzian, G. Kerstiens, Sorption and Transport of Gases and Vapors in Plant Cuticles, in: G.W. Ware (Ed.), Rev. Environ. Contam. Toxicol., Springer New York (1991) 65–128. http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4612-3196-7_2 (consulté le 28 Mai 2016).

[60] M. Pollard, F. Beisson, Y. Li, J.B. Ohlrogge, Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin, Trends Plant Sci. 13 (2008) 236–246.

[61] E. Curry, Effects of 1-MCP applied postharvest on epicuticular wax of apples (*Malus domestica* Borkh.) during storage, J. Sci. Food Agric. 88 (2008) 996–1006.

[62] A. Szakiel, C. Paczkowski, F. Pensec, C. Bertsch, Fruit cuticular waxes as a source of biologically active triterpenoids, Phytochem. Rev. 11 (2012) 263–284.

[63] E.A. Veraverbeke, P. Verboven, P. Van Oostveldt, B.M. Nicolai, Prediction of moisture loss across the cuticle of apple (*Malus sylvestris subsp mitis* (Wallr.)) during storage Part 1. Model development and determination of diffusion coefficients, Postharvest Biol. Technol. 30 (2003) 75–88.

[64] E. Dominguez, J. Cuartero, A. Heredia, An overview on plant cuticle biomechanics, Plant Sci. 181 (2011) 77–84. doi:10.1016/j.plantsci.2011.04.016.

[65] M. Ketata, Effet des prétraitements cryogéniques sur la déshydratation osmotique des bleuets, mémoire de Maîtrise en Sciences et Technologies des Aliments, Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université de Laval (2012).

[66] A. Konarska, Morphological, anatomical, and ultrastructural changes in *Vaccinium corymbosum* fruits during ontogeny, Acta Biol. Cracoviensia. 56 (2014) 35–48. doi:10.2478/abcsb-2014-0019.

[67] J.-P. Garrec, C. Henry, L. Le Maout, Cires épi- et intracuticulaires: Etude de leur séparation, de leurs caractéristiques chimiques et de leurs rôles respectifs dans la perméabilité cuticulaire, Environ. Exp. Bot. 35 (1995) 399–409.

[68] T. Dugé de Bernonville, Caractérisations histologique, moléculaire et biochimique des

interactions compatible et incompatible entre *Erwinia amylovora*, agent du feu bactérien, et le pommier (*Malus x domestica*), thèse de doctorat, Université d'Angers (2009).

[69] I. Molina, Biosynthesis of plant lipid polyester, (2010). <http://lipidlibrary.aocs.org/Biochemistry/content.cfm?ItemNumber=40311> (consulté le 30 Janvier 2016).

[70] I. Lara, B. Belge, L.F. Goulao, A Focus on the Biosynthesis and Composition of Cuticle in Fruits, *J. Agric. Food Chem.* 63 (2015) 4005–4019. doi:10.1021/acs.jafc.5b00013.

[71] C. Buschhaus, R. Jetter, Composition differences between epicuticular and intracuticular wax substructures: How do plants seal their epidermal surfaces?, *J. Exp. Bot.* 62 (2011) 841–853.

[72] A. Heredia, A. Matas, E. Domínguez, Investigating plant lipid biopolymers, *Biochem. Educ.* (2000) 50–51.

[73] B. Chen, Y. Li, Y. Guo, L. Zhu, J.L. Schnoor, Role of the Extractable Lipids and Polymeric Lipids in Sorption of Organic Contaminants onto Plant Cuticles, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 1517–1523. doi:10.1021/es7023725.

[74] E.J. Johnson, O. Dorot, J. Liu, B. Chefetz, B. Xing, Spectroscopic Characterization of Aliphatic Moieties in Four Plant Cuticles, *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 38 (2007) 2461–2478. doi:10.1080/00103620701588841.

[75] A. Heredia, Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1620 (2003) 1–7. doi:10.1016/S0304-4165(02)00510-X.

[76] T. Shepherd, D.W. Griffiths, The effects of stress on plant cuticular waxes, *New Phytol.* 171 (2006) 469–499.

[77] G. Bianchi, Plant waxes, in: *Waxes Chem. Mol. Biol. Funct.*, The Oily Press, Glasgow (1995) 175–222.

[78] G. Bonnier, *Revue Générale de Botanique*, Librairie Générale de l'Enseignement, tome 70, n°831-832, La cire cuticulaire des pommes (*Pirus malus* L.) (Etude morphologique, biochimique et physiologique) par P. Mazliak (1963).

[79] N.P. Morozova, E.G. Sal'kova, Study of the composition of apple cuticle, *Prikl. Biokhimiya Mikrobiol.* 2 (1966) 232–238.

[80] A.M.S. Fernandes, E.A. Baker, J.T. Martin, Studies on plant cuticle, *Ann. Appl. Biol.* 53 (1964) 43–58. doi:10.1111/j.1744-7348.1964.tb03779.x.

[81] R.D. Belding, S.M. Blankenship, E. Young, R.B. Leidy, Composition and variability of epicuticular waxes in apple cultivars, *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 123 (1998) 348–356.

[82] X. Dong, J. Rao, D.J. Huber, X. Chang, F. Xin, Wax composition of "Red Fuji" apple fruit during development and during storage after 1-methylcyclopropene treatment, *Hortic. Environ. Biotechnol.* 53 (2012) 288–297. doi:10.1007/s13580-012-0036-0.

- [83] G. Verardo, E. Pagani, P. Geatti, P. Martinuzzi, A thorough study of the surface wax of apple fruits, *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (2003) 659–667. doi:10.1007/s00216-003-1945-7.
- [84] R. Jetter, S. Schäffer, Chemical composition of the *Prunus laurocerasus* leaf surface. Dynamic changes of the epicuticular wax film during leaf development, *Plant Physiol.* 126 (2001) 1725–1737.
- [85] R. Jetter, S. Schaffer, M. Riederer, Leaf cuticular waxes are arranged in chemically and mechanically distinct layers: evidence from *Prunus laurocerasus* L, *Plant Cell Environ.* 23 (2000) 619–628.
- [86] M. Riedel, A. Eichner, R. Jetter, Slippery surfaces of carnivorous plants: composition of epicuticular wax crystals in *Nepenthes alata* Blanco pitchers, *Planta.* 218 (2003) 87–97.
- [87] M. Riedel, A. Eichner, H. Meimberg, R. Jetter, Chemical composition of epicuticular wax crystals on the slippery zone in pitchers of five *Nepenthes species* and hybrids, *Planta.* 225 (2007) 1517–1534.
- [88] W. Barthlott, C. Neinhuis, D. Cutler, F. Ditsch, I. Meusel, I. Theisen, H. Wilhelmi, Classification and terminology of plant epicuticular waxes, *Bot. J. Linn. Soc.* 126 (1998) 237–260. doi:10.1111/j.1095-8339.1998.tb02529.x.
- [89] R. Jetter, M. Riederer, In vitro Reconstitution of Epicuticular Wax Crystals: Formation of Tubular Aggregates by Long-Chain Secondary Alkanediols, *Bot. Acta.* 108 (1995) 111–120. doi:10.1111/j.1438-8677.1995.tb00840.x.
- [90] M. Wen, C. Buschhaus, R. Jetter, Nanotubules on plant surfaces: chemical composition of epicuticular wax crystals on needles of *Taxus baccata* L, *Phytochemistry.* 67 (2006) 1808–1817. doi:10.1016/j.phytochem.2006.01.018.
- [91] S. Tsubaki, K. Sugimura, Y. Teramoto, K. Yonemori, J. Azuma, Cuticular Membrane of Fuyu Persimmon Fruit Is Strengthened by Triterpenoid Nano-Fillers, *PLOS ONE.* 8 (2013) e75275. doi:10.1371/journal.pone.0075275.
- [92] C.-G. Grigoras, Valorisation des fruits et des sous-produits de l'industrie de transformation des fruits par extraction des composés bioactifs, Chimie et Génie de l'Environnement, thèse de l'Université d'Orléans et "Vasile Alecsandri" de Bacau (2012).
- [93] R.T.S. Frighetto, R.M. Welendorf, E.N. Nigro, N. Frighetto, A.C. Siani, Isolation of ursolic acid from apple peels by high speed counter-current chromatography, *Food Chem.* 106 (2008) 767–771. doi:10.1016/j.foodchem.2007.06.003.
- [94] E. Curry, Factors associated with apple lenticel breakdown, Washington State University, Tree Fruit Research and Extension Center (2003).
- [95] E. Curry, Lenticel and cuticle disorders: a survey, in: Wash. Tree Fruit Postharvest Conf., Wenatchee, WA, March 13th and 14th 2001.
- [96] A. Solovchenko, M. Merzlyak, Optical properties and contribution of cuticle to UV protection in plants: experiments with apple fruit, *Photochem. Photobiol. Sci.* 2 (2003) 861–866.

- [97] K. Koch, W. Barthlott, S. Koch, A. Hommes, K. Wandelt, W. Mamdouh, S. De-Feyter, P. Broekmann, Structural analysis of wheat wax (*Triticum aestivum*, c.v. "Naturastar" L.): from the molecular level to three dimensional crystals, *Planta*. 223 (2005) 258–270. doi:10.1007/s00425-005-0081-3.
- [98] J.A. Heredia-Guerrero, J.J. Benítez, E. Domínguez, I.S. Bayer, R. Cingolani, A. Athanassiou, A. Heredia, Infrared and Raman spectroscopic features of plant cuticles: a review, *Plant Biophys. Model.* 5 (2014) 305. doi:10.3389/fpls.2014.00305.
- [99] S. Roy, W.S. Conway, A.E. Watada, C.E. Sams, E.F. Erbe, W.P. Wergin, Changes in the Ultrastructure of the Epicuticular Wax and Postharvest Calcium Uptake in Apples, *HortScience*. 34 (1999) 121–124.
- [100] M. Knoche, E. Grimm, Surface Moisture Induces Microcracks in the Cuticle of "Golden Delicious" Apple, *HortScience*. 43 (2008) 1929–1931.
- [101] R. Prat, L'espace gazeux des végétaux, *Biologie et Multimédia*, Université Pierre et Marie Curie, UFR des Sciences de la Vie (2005). <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/gaz/stomate.htm> (consulté le 30 Janvier 2016).
- [102] F. Gniwotta, G. Vogg, V. Gartmann, T.L.W. Carver, M. Riederer, R. Jetter, What Do Microbes Encounter at the Plant Surface? Chemical Composition of Pea Leaf Cuticular Waxes, *Plant Physiol.* 139 (2005) 519–530. doi:10.1104/pp.104.053579.
- [103] H.J. Ensikat, C. Neinhuis, W. Barthlott, Direct Access to Plant Epicuticular Wax Crystals by a New Mechanical Isolation Method, *Int. J. Plant Sci.* 161 (2000) 143–148.
- [104] J.L. Coward, A method for selective isolation and aggregation of epicuticular wax nanotubes in *Picea pungens*, *Flora - Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants*. 202 (2007) 462–470. doi:10.1016/j.flora.2006.10.005.
- [105] D.M. Hall, A Study of the Surface Wax Deposits on Apple Fruit, *Aust. J. Biol. Sci.* 19 (1966) 1017–1026.
- [106] H.J. Ensikat, M. Boese, W. Mader, W. Barthlott, K. Koch, Crystallinity of plant epicuticular waxes: electron and X-ray diffraction studies, *Chem. Phys. Lipids*. 144 (2006) 45–59. doi:10.1016/j.chemphyslip.2006.06.016.
- [107] M. Riederer, G. Schneider, Comparative study of the composition of waxes extracted from isolated leaf cuticles and from whole leaves of *Citrus*: Evidence for selective extraction, *Physiol. Plant.* 77 (1989) 373–384. doi:10.1111/j.1399-3054.1989.tb05656.x.
- [108] D.V. Richmond, J.T. Martin, Studies on Plant Cuticle: The Composition of the Cuticle of Apple Leaves and Fruits, *Ann. Appl. Biol.* 47 (1959) 583–592. doi:10.1111/j.1744-7348.1959.tb07290.x.
- [109] P. Luque, A. Heredia, Glassy state in plant cuticles during growth, *Z. Für Naturforschung*. (1994) 273–275.
- [110] A.P. Deshmukh, A.J. Simpson, P.G. Hatcher, Evidence for cross-linking in tomato cutin using HR-MAS NMR spectroscopy, *Phytochemistry*. 64 (2003) 1163–1170.

- [111] B. Chen, B. Xing, Sorption and Conformational Characteristics of Reconstituted Plant Cuticular Waxes on Montmorillonite, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 8315–8323. doi:10.1021/es050840j.
- [112] M. Shechter, B. Xing, F.-D. Kopinke, B. Chefetz, Competitive sorption-desorption behavior of triazine herbicides with plant cuticular fractions, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 7761–7768. doi:10.1021/jf0614488.
- [113] Y. Li, B. Chen, Phenanthrene Sorption by Fruit Cuticles and Potato Periderm with Different Compositional Characteristics, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 637–644. doi:10.1021/jf802719h.
- [114] Y. Li, B. Chen, L. Zhu, Single-solute and bi-solute sorption of phenanthrene and pyrene onto pine needle cuticular fractions, *Environ. Pollut. Barking Essex* 1987. 158 (2010) 2478–2484. doi:10.1016/j.envpol.2010.03.021.
- [115] J. Schönherr, M. Riederer, Plant cuticles sorb lipophilic compounds during enzymatic isolation, *Plant Cell Environ.* 9 (1986) 459–466. doi:10.1111/j.1365-3040.1986.tb01761.x.
- [116] H. Bauer, J. Schönherr, Determination of mobilities of organic compounds in plant cuticles and correlation with molar volumes, *Pestic. Sci.* 35 (1992) 1–11. doi:10.1002/ps.2780350102.
- [117] P. Baur, H. Marzouk, J. Schönherr, H. Bauer, Mobilities of organic compounds in plant cuticles as affected by structure and molar volumes of chemicals and plant species, *Planta.* 199 (1996) 404–412. doi:10.1007/BF00195732.
- [118] A. Buchholz, P. Baur, J. Schönherr, Differences among plant species in cuticular permeabilities and solute mobilities are not caused by differential size selectivities, *Planta.* 206 (1998) 322–328. doi:10.1007/s004250050407.
- [119] A. Buchholz, J. Schönherr, Thermodynamic analysis of diffusion of non-electrolytes across plant cuticles in the presence and absence of the plasticiser tributyl phosphate, *Planta.* 212 (2000) 103–111. doi:10.1007/s004250000372.
- [120] L. Schreiber, M. Skrabs, K.D. Hartmann, P. Diamantopoulos, E. Simanova, J. Santrucek, Effect of humidity on cuticular water permeability of isolated cuticular membranes and leaf disks, *Planta.* 214 (2001) 274–282.
- [121] R.E. Stark, B. Yan, S.M. Stanley-Fernandez, Z.-J. Chen, J.R. Garbow, NMR characterization of hydration and thermal stress in tomato fruit cuticles, *Phytochemistry.* 69 (2008) 2689–2695. doi:10.1016/j.phytochem.2008.08.016.
- [122] S. Chatterjee, S. Sarkar, J. Oktawiec, Z. Mao, O. Niitsoo, R.E. Stark, Isolation and Biophysical Study of Fruit Cuticles, *J. Vis. Exp. JoVE.* (2012). doi:10.3791/3529.
- [123] B.P. Khanal, M. Knoche, S. Bußler, O. Schlüter, Evidence for a radial strain gradient in apple fruit cuticles, *Planta.* 240 (2014) 891–897. doi:10.1007/s00425-014-2132-0.
- [124] M. Shechter, B. Xing, F.-D. Kopinke, B. Chefetz, Competitive sorption-desorption behavior of triazine herbicides with plant cuticular fractions, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 7761–7768. doi:10.1021/jf0614488.

- [125] B. Chen, Y. Li, Y. Guo, L. Zhu, J.L. Schnoor, Role of the extractable lipids and polymeric lipids in sorption of organic contaminants onto plant cuticles, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 1517–1523.
- [126] M. Riederer, L. Schreiber, Waxes - The transport barriers of plant cuticles, in: R.J. Hamilton (Ed.), *Waxes Chem. Mol. Biol. Funct.*, The Oily Press (1995).
- [127] K.M. Maguire, A. Lang, N.H. Banks, A. Hall, D. Hopcroft, R. Bennett, Relationship between water vapour permeance of apples and micro-cracking of the cuticle, *Postharvest Biol. Technol.* 17 (1999) 89–96.
- [128] G. Vogg, S. Fischer, J. Leide, E. Emmanuel, R. Jetter, A.A. Levy, M. Riederer, Tomato fruit cuticular waxes and their effects on transpiration barrier properties: functional characterization of a mutant deficient in a very-long-chain fatty acid β -ketoacyl-CoA synthase, *J. Exp. Bot.* 55 (2004) 1401–1410.
- [129] P.J. Holloway, Chemistry of leaf waxes in relation to wetting, *J. Sci. Food Agric.* 20 (1969) 124–128. doi:10.1002/jsfa.2740200214.
- [130] L. Schreiber, A Mechanistic Approach Towards Surfactant/Wax Interactions - Effects of Octaethyleneglycolmonododecylether on Sorption and Diffusion of Organic-Chemicals in Reconstituted Cuticular Wax of Barley Leaves, *Pestic. Sci.* 45 (1995) 1–11.
- [131] E.C. Reynhardt, M. Riederer, Structures and molecular dynamics of plant waxes, *Eur. Biophys. J.* 23 (1994) 59–70. doi:10.1007/BF00192206.
- [132] M. Riederer, G. Schneider, The effect of the environment on the permeability and composition of *Citrus*, *Planta.* 180 (1990) 154–165. doi:10.1007/BF00193990.
- [133] L. Schreiber, K. Schorn, T. Heimbürg, 2H NMR study of cuticular wax isolated from *Hordeum vulgare* L. leaves: identification of amorphous and crystalline wax phases, *Eur. Biophys. J.* 26 (1997) 371–380. doi:10.1007/s002490050091.
- [134] J. Schönherr, Characterization of aqueous pores in plant cuticles and permeation of ionic solutes, *J. Exp. Bot.* 57 (2006) 2471–2491. doi:10.1093/jxb/erj217.
- [135] C.J. Wang, Z.Q. Liu, Foliar uptake of pesticides - Present status and future challenge, *Pestic. Biochem. Physiol.* 87 (2007) 1–8.
- [136] L. Schreiber, Polar Paths of Diffusion across Plant Cuticles: New Evidence for an Old Hypothesis, *Ann. Bot.* 95 (2005) 1069–1073. doi:10.1093/aob/mci122.
- [137] A. Sabljic, H. Guesten, J. Schoenherr, M. Riederer, Modeling plant uptake of airborne organic chemicals. 1. Plant cuticle/water partitioning and molecular connectivity, *Environ. Sci. Technol.* 24 (1990) 1321–1326. doi:10.1021/es00079a004.
- [138] M. Riederer, Estimating partitioning and transport of organic chemicals in the foliage/atmosphere system: discussion of a fugacity-based model, *Environ. Sci. Technol.* 24 (1990) 829–837. doi:10.1021/es00076a006.
- [139] N. Lichiheb, C. Bedos, E. Personne, E. Barriuso, Synthèse des connaissances sur le transfert des

pesticides vers l'atmosphère par volatilisation depuis les plantes, *Pollut. Atmos.* N°224 (2015) 12p.

[140] J. Schönherr, P. Baur, Modelling Penetration of Plant Cuticles by Crop Protection Agents and Effects of Adjuvants on their Rates of Penetration, *Pestic Sci.* 42 (1994) 185–208.

[141] A. Buchholz, Characterization of the diffusion of non-electrolytes across plant cuticles: properties of the lipophilic pathway, *J. Exp. Bot.* 57 (2006) 2501–2513. doi:10.1093/jxb/erl023.

[142] E.A. Baker, A.L. Hayes, R.C. Butler, Physicochemical properties of agrochemicals: Their effects on foliar penetration, *Pestic. Sci.* 34 (1992) 167–182. doi:10.1002/ps.2780340212.

[143] M. Riederer, Estimating partitioning and transport of organic chemicals in the foliage/atmosphere system: discussion of a fugacity-based model, *Environ. Sci. Technol.* 24 (1990) 829–837. doi:10.1021/es00076a006.

[144] S. Cotugno, G. Mensitieri, P. Musto, L. Nicolais, Water sorption and transport in polymers. <http://www.caimateriali.org/?id=33> (consulté le 30 Juin 2016).

[145] L. Schreiber, J. Schönherr, Mobilities of organic compounds in reconstituted cuticular wax of barley leaves: Determination of diffusion coefficients, *Pestic. Sci.* 38 (1993) 353–361. doi:10.1002/ps.2780380413.

[146] D. Mota-Sanchez, B. Gregg, E. Hoffmann, J. Flore, J.C. Wise, Penetrative and Dislodgeable Residue Characteristics of C-14-Insecticides in Apple Fruit, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 2958–2966.

[147] E. Wild, J. Dent, J.L. Barber, G.O. Thomas, K.C. Jones, A Novel Analytical Approach for Visualizing and Tracking Organic Chemicals in Plants, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 4195–4199. doi:10.1021/es049915u.

[148] C.M. Hansen, Diffusion in polymers. <http://www.hansen-solubility.com/downloads.php> (2012) (consulté le 01 Juin 2016).

[149] C.M. Hansen, Hansen solubility parameters: a user's handbook, CRC Press (2000).

[150] L. Schreiber, Review of sorption and diffusion of lipophilic molecules in cuticular waxes and the effects of accelerators on solute mobilities, *J. Exp. Bot.* 57 (2006) 2515–2523. doi:10.1093/jxb/erj173.

[151] Y. Li, Y. Deng, B. Chen, Sorption of chlorophenols onto fruit cuticles and potato periderm, *J. Environ. Sci.-China.* 24 (2012) 675–681.

[152] Z. Liu, Effects of surfactants on foliar uptake of herbicides - a complex scenario, *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 35 (2004) 149–153. doi:10.1016/j.colsurfb.2004.02.016.

[153] R.J.L. Ramsey, G.R. Stephenson, J.C. Hall, A review of the effects of humidity, humectants, and surfactant composition on the absorption and efficacy of highly water-soluble herbicides, *Pestic. Biochem. Physiol.* 82 (2005) 162–175. doi:10.1016/j.pestbp.2005.02.005.

[154] J. Schönherr, Effects of alcohols, glycols and monodisperse ethoxylated alcohols on mobility of 2,4-D in isolated plant cuticles, *Pestic. Sci.* 39 (1993) 213–223. doi:10.1002/ps.2780390308.

- [155] Z. Mouloungui, C. Gauvrit, Synthesis and influence of fatty acid esters on the foliar penetration of herbicides, *Ind. Crops Prod.* 8 (1998) 1–15. doi:10.1016/S0926-6690(97)00078-2.
- [156] J.M. Zielinski, J.L. Duda, Predicting polymer/solvent diffusion coefficients using free-volume theory, *AIChE J.* 38 (1992) 405–415. doi:10.1002/aic.690380309.
- [157] Y. Li, B. Chen, Z. Chen, L. Zhu, Surfactant effects on the affinity of plant cuticles with organic pollutants, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 3681–3688. doi:10.1021/jf803917w.
- [158] Z. Liu, Confocal laser scanning microscopy - an attractive tool for studying the uptake of xenobiotics into plant foliage, *J. Microsc.-Oxf.* 213 (2004) 87–93.
- [159] R.R. Rasmussen, M.E. Poulsen, H.C.B. Hansen, Distribution of multiple pesticide residues in apple segments after home processing, *Food Addit. Contam. Part -Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 20 (2003) 1044–1063.
- [160] R. Riccio, M. Trevisan, E. Capri, Effect of surface waxes on the persistence of chlorpyrifos-methyl in apples, strawberries and grapefruits, *Food Addit. Contam.* 23 (2006) 683–692.
- [161] J.S. Asensio, C.S. Barrio, M.T. Galarreta-Juez, J.G. Bernal, Study of the decay of diazinon and chlorpyrifos in apple samples, using gas chromatography, *Food Chem.* 42 (1991) 213–224. doi:10.1016/0308-8146(91)90035-M.
- [162] M.P. Clavijo, M.P. Medina, J.S. Asensio, J. Galban, Decay study of pesticide residues in apple samples, *J. Chromatogr. A.* 740 (1996) 146–150.
- [163] J. Kovacova, V. Kocourek, J. Kohoutkova, M. Lansky, J. Hajslova, Production of apple-based baby food: changes in pesticide residues, *Food Addit. Contam. Part A.* 31 (2014) 1089–1099. doi:10.1080/19440049.2014.912356.
- [164] C.S. Barrio, J.S. Asensio, M.P. Medina, M.P. Clavijo, J. Galban, Evaluation of the Decay of Malathion, Dichlofluanid and Fenitrothion Pesticides in Apple Samples, Using Gas-Chromatography, *Food Chem.* 52 (1995) 305–309.
- [165] J. Sanz-Asensio, A.P. Martinez-Prado, M. Plaza-Medina, M.T. Martinez-Soria, M. Perez-Clavijo, Behaviour of acephate and its metabolite methamidophos in apple samples, *Chromatographia.* 49 (1999) 155–160.
- [166] J. Ticha, J. Hajslova, M. Jech, J. Honzicek, O. Lacina, J. Kohoutkova, V. Kocourek, M. Lansky, J. Kloutvorova, V. Falta, Changes of pesticide residues in apples during cold storage, *Food Control.* 19 (2008) 247–256.
- [167] EFSA, Pesticides. <https://www.efsa.europa.eu/fr/topics/topic/pesticides> (consulté le 30 Janvier 2016).
- [168] Alim'Agri, Tout savoir sur les pesticides et leurs autorisations de mise sur le marché. <http://agriculture.gouv.fr/tout-savoir-sur-les-pesticides-et-leurs-autorisations-de-mise-sur-le-marche> (consulté le 30 Janvier 2016).
- [169] M. Nič, J. Jiráť, B. Košata, A. Jenkins, A. McNaught, eds., *IUPAC Compendium of Chemical*

Terminology: Gold Book, 2.1.0, IUPAC, Research Triangle Park, NC (2009). <http://goldbook.iupac.org> (consulté le 15 Juillet 2016).

[170] Observatoire des Résidus de Pesticides. <http://www.observatoire-pesticides.fr/index.php?pageid=302> (consulté le 30 Janvier 2016).

[171] Actualisation des indicateurs de risque alimentaire liés aux résidus de pesticide, ANSES, Maisons-Alfort (2014). <https://www.anses.fr/fr/system/files/AUT2013sa0138.pdf> (consulté le 01 Février 2016).

[172] European Food Safety Authority, The 2012 European Union Report on pesticide residues in food, EFSA J. 12 (2014). doi:10.2903/j.efsa.2014.3942.

[173] Direction Générale de la Prévention des risques, Les Polluants organiques persistants, Ministère de l'Ecologie, du Développement durable et de l'Energie, La Défense, Paris. http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/Polluants-organiques-persistants-POP_light.pdf (consulté le 30 Juin 2016).

[174] J. Wodli, Règlement POP CE N°850/2004, Ministère de l'Ecologie, du Développement durable et de l'Energie (2015). http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/20151020_PIC_POP_support_part3.pdf (consulté le 30 Juin 2016).

[175] Guidelines for the generation of data concerning residues as provided in Annex II part A, section 6 and Annex III, part A, section 8 of Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market, The European Commission (1997). http://ec.europa.eu/food/fs/sfp/ph_ps/pest/app-h.pdf (consulté le 01 Février 2016).

[176] E. Sobhanzadeh, N.K.A. Bakar, M.R. Abas, K. Nemat, Sample Preparation Methods for Pesticides Analysis in Food Matrices and Environmental Samples by Chromatography-Based Techniques: A Review, Malays. J. Fundam. Appl. Sci. 5 (2014) 106-128. doi:10.11113/mjfas.v5n2.294.

[177] J. Fenik, M. Tankiewicz, M. Biziuk, Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables, TrAC Trends Anal. Chem. 30 (2011) 814–826. doi:10.1016/j.trac.2011.02.008.

[178] A. Wilkowska, M. Biziuk, Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology, Food Chem. 125 (2011) 803–812. doi:10.1016/j.foodchem.2010.09.094.

[179] A. de Kok, M. Hiemstra, C.P. Vreeker, Improved cleanup method for the multiresidue analysis of N-methylcarbamates in grains, fruits and vegetables by means of HPLC with postcolumn reaction and fluorescence detection, Chromatographia. 24 (1987) 469–476. doi:10.1007/BF02688528.

[180] G.F. Pang, Y.M. Liu, C.L. Fan, J.J. Zhang, Y.Z. Cao, X.M. Li, Z.Y. Li, Y.P. Wu, T.T. Guo, Simultaneous determination of 405 pesticide residues in grain by accelerated solvent extraction then gas chromatography-mass spectrometry or liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Anal. Bioanal. Chem. 384 (2006) 1366–1408.

[181] K. Adou, W.R. Bontoyan, P.J. Sweeney, Multiresidue method for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables by accelerated solvent extraction and capillary gas chromatography, J. Agric. Food Chem. 49 (2001) 4153–4160.

- [182] C. Blasco, G. Font, Y. Pico, Analysis of pesticides in fruits by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-ion trap-triple stage mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1098 (2005) 37–43.
- [183] T. Tanaka, T. Hori, T. Asada, K. Oikawa, K. Kawata, Simple one-step extraction and cleanup by pressurized liquid extraction for gas chromatographic-mass spectrometric determination of pesticides in green leafy vegetables, *J. Chromatogr. A.* 1175 (2007) 181–186.
- [184] B.E. Richter, F. Hoefler, M. Linkerhaegner, Determining organophosphorus pesticides in foods using accelerated solvent extraction with large sample sizes, *Lc Gc N. Am.* 19 (2001) 408–412.
- [185] J. Ezzell, Accelerated solvent extraction (ASE) of pesticide residue in food products, *GIT Lab. J.* (2000) 17–19.
- [186] S.J. Lehotay, Supercritical fluid extraction of pesticides in foods, *J. Chromatogr. A.* (1997) 289–312.
- [187] D.A. Lambropoulou, T.A. Albanis, Liquid-phase micro-extraction techniques in pesticide residue analysis, *J. Biochem. Biophys. Methods.* 70 (2007) 195–228. doi:10.1016/j.jbbm.2006.10.004.
- [188] I.S. Ibarra, J.A. Rodriguez, C.A. Galan-Vidal, A. Cepeda, J.M. Miranda, Magnetic Solid Phase Extraction Applied to Food Analysis, *Magnetic Solid Phase Extraction Applied to Food Analysis, J. Chem.* (2015) 13p. doi:10.1155/2015/919414.
- [189] J.J. Villaverde, B. Sevilla-Morán, C. López-Goti, J.L. Alonso-Prados, P. Sandín-España, Trends in analysis of pesticide residues to fulfil the European Regulation (EC) No. 1107/2009, *TrAC Trends Anal. Chem.* 80 (2016) 568–580. doi:10.1016/j.trac.2016.04.017.
- [190] M. Biziuk, J. Stocka, the Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Gdansk University of Technology, Narutowicza Str. 11/12, 80-233 Gdansk, Poland, Multiresidue Methods for Determination of Currently Used Pesticides in Fruits and Vegetables Using QuEChERS Technique, *Int. J. Environ. Sci. Dev.* 6 (2015) 18–22. doi:10.7763/IJESD.2015.V6.554.
- [191] M. Iwasaki, I. Sato, Y. Jin, N. Saito, S. Tsuda, Problems of positive list system revealed by survey of pesticide residue in food, *J. Toxicol. Sci.* 32 (2007) 179–84.
- [192] O.G. Cabrices, Automated Sample Preparation and Analysis Workflows for Pesticide Residue Screenings in Food Samples using DPX-QuEChERS with LC-MS-MS, *Gerstel Appl. Notes. AppNote 8/2013* (2013).
- [193] P. Kaewsuya, W.E. Brewer, J. Wong, S.L. Morgan, Automated QuEChERS tips for analysis of pesticide residues in fruits and vegetables by GC-MS, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 2299–2314. doi:10.1021/jf304648h.
- [194] H. Guan, W.E. Brewer, S.T. Garris, C. Craft, S.L. Morgan, Multiresidue Analysis of Pesticides in Fruits and Vegetables Using Disposable Pipette Extraction (DPX) and Micro-Luke Method, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 5973–5981. doi:10.1021/jf903448w.
- [195] C. Margoum, C. Guillemain, D. Lavieille, M. Coquery, Développement et application in situ de la technique SBSE pour l'échantillonnage et le dosage de pesticides dans l'eau, in: 40ème Congrès Groupe Fr. Pestic. (2010).

- [196] L. Maggi, M. Carmona, C.P. del Campo, A. Zalacain, J. Hurtado de Mendoza, F.A. Mocholi, G.L. Alonso, Multi-residue contaminants and pollutants analysis in saffron spice by stir bar sorptive extraction and gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1209 (2008) 55–60.
- [197] C. Oellig, W. Schwack, Planar solid phase extraction-A new clean-up concept in multi-residue analysis of pesticides by liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 6540–6547.
- [198] J. Sherma, Review of advances in the thin layer chromatography of pesticides: 2008-2010, *J. Environ. Sci. Health Part B-Pestic. Food Contam. Agric. Wastes.* 46 (2011) 557–568.
- [199] A. Marston, Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 2676–2683.
- [200] C.E. Mendoza, Thin-layer chromatography and enzyme inhibition techniques, *J. Chromatogr.* 78 (1973) 29–40.
- [201] C.E. Mendoza, J.B. Shields, Determination of some carbamates by enzyme inhibition techniques using thin-layer chromatography and colorimetry, *J. Agric. Food Chem.* 21 (1973) 178–84.
- [202] C.E. Mendoza, P.J. Wales, H.A. McLeod, W.P. McKinley, Enzymatic detection of ten organophosphorus pesticides and carbaryl on thin-layer chromatograms: an evaluation of indoxyl, substituted indoxyl and 1-naphthyl acetates as substrates of esterases, *Analyst.* 93 (1968) 34–38.
- [203] C.E. Mendoza, P.J. Wales, H.A. McLeod, W.P. McKinley, Thin-layer chromatographic-enzyme inhibition procedure to screen for organophosphorus pesticides in plant extracts without elaborate clean-up, *Analyst.* 93 (1968) 173–177.
- [204] C. Weins, H. Jork, Toxicological evaluation of harmful substances by in situ enzymatic and biological detection in high-performance thin-layer chromatography, *J. Chromatogr. A.* 750 (1996) 403–407.
- [205] M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Stajnbaher, F.J. Schenck, 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.* 86 (2003) 412–431.
- [206] M.Á. González-Curbelo, B. Socas-Rodríguez, A.V. Herrera-Herrera, J. González-Sálamo, J. Hernández-Borges, M.Á. Rodríguez-Delgado, Evolution and applications of the QuEChERS method, *TrAC Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 169–185. doi:10.1016/j.trac.2015.04.012.
- [207] L. Zhao, J. Stevens, Optimizing Recoveries of Planar Pesticides in Spinach Using Toluene and Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC Kits with Graphitized Carbon, application note, Agilent Technologies publication 5990-4073EN (2012).
- [208] B.C. Verma, H.K. Thakur, J. Singh, D.K. Sharma, A new spectrophotometric method for the determination of dithianon in commercial formulations and its residues in foodstuffs, *J. Aoac Int.* 82 (1999) 1298–1302.
- [209] A. Abad-Fuentes, F.A. Esteve-Turrillas, C. Agullo, A. Abad-Somovilla, J.V. Mercader,

Development of competitive enzyme-linked immunosorbent assays for boscalid determination in fruit juices, *Food Chem.* 135 (2012) 276–284.

[210] C.B.S. Roepcke, S.B. Muench, H. Schulze, T.T. Bachmann, T. Bachmann, R.D. Schmid, B. Hauer, Analysis of phosphorothionate pesticides using a chloroperoxidase pretreatment and acetylcholinesterase biosensor detection, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 8748–8756. doi:10.1021/jf1013204.

[211] J.-W. Choi, Y.-K. Kim, B.-K. Oh, S.-Y. Song, W.H. Lee, Optical biosensor for simultaneous detection of captan and organophosphorus compounds, *Biosens. Bioelectron.* 18 (2003) 591–597.

[212] M. Płonka, S. Walorczyk, M. Miszczyk, Chromatographic methods for the determination of active substances and characterization of their impurities in pesticide formulations, *TrAC Trends Anal. Chem.* 85 part B (2016) 76-80. doi:10.1016/j.trac.2016.03.011.

[213] T. Cserhati, M. Szogyi, Chromatographic Determination of Pesticides in Foods and Food Products, *J. Nutr. Food Sci.* 2 (2012) 10p. doi:10.4172/2155-9600.1000126.

[214] K. Banerjee, R.H. Savant, S.C. Utture, S.H. Patil, S. Dasgupta, P.G. Adsule, Analytical challenges for monitoring of phtalimide pesticides in fruits and vegetables and some solutions, in: *Eur. Pestic. Residue Workshop* (2010).

[215] D. Granier, J. Beaumont, S. Meunier, R. Aujay, M.P. Strub, O. Blanchard, Mise au point des techniques de prélèvement et d'analyse des biocides dans l'environnement intérieur, INERIS (2001). <http://www.ineris.fr/centredoc/cr376.pdf> (consulté le 01 Février 2016).

[216] A. Périquet, M. Boisset, F. Casse, M. Catteau, J.-M. Lecerf, C. Leguille, Pesticides, risques et sécurité alimentaire, *Aprifel* (2004). http://www.aprifel.com/userfiles/file/pesticides_risques_securite_a.pdf (consulté le 01 Février 2016).

[217] R. Raina, Chemical Analysis of Pesticides Using GC/MS, GC/MS/MS, and LC/MS/MS, in: M. Stoytcheva (Ed.), *Pestic. - Strateg. Pestic. Anal.*, InTech (2011). <http://www.intechopen.com/books/pesticides-strategies-for-pesticides-analysis/chemical-analysis-of-pesticides-using-gc-ms-gc-ms-ms-and-lc-ms-ms> (consulté le 24 Mars 2016).

[218] K. El Mrabet, Développement d'une méthode d'analyse de résidus de pesticides par dilution isotopique associée à la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem dans les matrices céréalières après extraction en solvant chaud pressurisé, thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie (2008).

[219] S.N. Sinha, M.V.V. Rao, K. Vasudev, M. Odetokun, A liquid chromatography mass spectrometry-based method to measure organophosphorous insecticide, herbicide and non-organophosphorous pesticide in grape and apple samples, *Food Control.* 25 (2012) 636–646.

[220] Ż. Bargańska, M. Ślebioda, J. Namieśnik, Determination of Pesticide Residues in Honeybees using Modified QUEChERS Sample Work-Up and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *Molecules.* 19 (2014) 2911–2924. doi:10.3390/molecules19032911.

- [221] J. Hajslova, J. Zrostlikova, Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices, *J. Chromatogr. A.* (2003) 181–197. doi:10.1016/S0021-9673(03)00539-9.
- [222] A.G. Frenich, R. Romero-González, M. del Mar Aguilera-Luiz, Comprehensive analysis of toxics (pesticides, veterinary drugs and mycotoxins) in food by UHPLC-MS, *TrAC Trends Anal. Chem.* 63 (2014) 158–169. doi:10.1016/j.trac.2014.06.020.
- [223] L.B. Abdulra'uf, G.H. Tan, Multivariate study of parameters in the determination of pesticide residues in apple by headspace solid phase microextraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry using experimental factorial design, *Food Chem.* 141 (2013) 4344–4348. doi:10.1016/j.foodchem.2013.07.022.
- [224] C. Chen, Y. Qian, Q. Chen, C. Tao, C. Li, Y. Li, Evaluation of pesticide residues in fruits and vegetables from Xiamen, China, *Food Control.* 22 (2011) 1114–1120. doi:10.1016/j.foodcont.2011.01.007.
- [225] S.C. Cunha, J.O. Fernandes, M.B.P.P. Oliveira, Fast analysis of multiple pesticide residues in apple juice using dispersive liquid-liquid microextraction and multidimensional gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 8835–8844. doi:10.1016/j.chroma.2009.10.051.
- [226] L. Cherta, T. Portolés, J. Beltran, E. Pitarch, J.G.J. Mol, F. Hernández, Application of gas chromatography–(triple quadrupole) mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization for the determination of multiclass pesticides in fruits and vegetables, *J. Chromatogr. A.* 1314 (2013) 224–240. doi:10.1016/j.chroma.2013.09.029.
- [227] J. Martins, C. Esteves, A. Limpo-Faria, P. Barros, N. Ribeiro, T. Simões, M. Correia, C. Delerue-Matos, Analysis of six fungicides and one acaricide in still and fortified wines using solid-phase microextraction–gas chromatography/tandem mass spectrometry, *Food Chem.* 132 (2012) 630–636. doi:10.1016/j.foodchem.2011.10.102.
- [228] Y. Fillatre, D. Rondeau, B. Bonnet, A. Daguin, A. Jadas-Hecart, P.-Y. Communal, Multiresidue Analysis of Multiclass Pesticides in Lavandin Essential Oil by LC/MS/MS Using the Scheduled Selected Reaction Monitoring Mode, *Anal. Chem.* 83 (2011) 109–117.
- [229] F.J. Camino-Sanchez, A. Zafra-Gomez, J. Ruiz-Garcia, R. Bermudez-Peinado, O. Ballesteros, A. Navalon, J.L. Vilchez, UNE-EN ISO/IEC 17025:2005 accredited method for the determination of 121 pesticide residues in fruits and vegetables by gas chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Food Compos. Anal.* 24 (2011) 427–440.
- [230] G.-F. Pang, Y.-Z. Cao, J.-J. Zhang, C.-L. Fan, Y.-M. Liu, X.-M. Li, G.-Q. Jia, Z.-Y. Li, Y.-Q. Shi, Y.-P. Wu, T.-T. Guo, Validation study on 660 pesticide residues in animal tissues by gel permeation chromatography cleanup/gas chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1125 (2006) 1–30.
- [231] L. Silvestro, I. Tarcomnicu, S. Rizea, Matrix Effects in Mass Spectrometry Combined with Separation Methods — Comparison HPLC, GC and Discussion on Methods to Control these Effects, in: A.V. Coelho (Ed.), *Tandem Mass Spectrom. - Mol. Charact.*, InTech (2013). <http://www.intechopen.com/books/tandem-mass-spectrometry-molecular-characterization/matrix->

effects-in-mass-spectrometry-combined-with-separation-methods-comparison-hplc-gc-and-discussi (consulté le 24 Mars 2016).

[232] J. Hajslova, T. Cajka, Gas chromatography in food analysis, in: *Handb. Food Anal. Instrum.*, Taylor & Francis Group, LLC (2008).

[233] F.A. de Sousa, A.I. Guido Costa, M.E.L.R. de Queiroz, R.F. Teófilo, A.A. Neves, G.P. de Pinho, Evaluation of matrix effect on the GC response of eleven pesticides by PCA, *Food Chem.* 135 (2012) 179–185. doi:10.1016/j.foodchem.2012.04.063.

[234] Y. Wang, H.-Y. Jin, S.-C. Ma, J. Lu, R.-C. Lin, Determination of 195 pesticide residues in Chinese herbs by gas chromatography-mass spectrometry using analyte protectants, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 334–342.

[235] H. Kwon, S.J. Lehotay, L. Geis-Asteggiane, Variability of matrix effects in liquid and gas chromatography-mass spectrometry analysis of pesticide residues after QuEChERS sample preparation of different food crops, *J. Chromatogr. A.* 1270 (2012) 235–245. doi:10.1016/j.chroma.2012.10.059.

[236] G.C.R.M. Andrade, R.M.O. Freguglia, R.P.Z. Furlani, N.H. Torres, V.L. Tornisiello, Determination of pesticide residues in tomato using dispersive solid-phase extraction and gas chromatography/ion trap mass spectrometry, *J. Braz. Chem. Soc.* 22 (2011) 1701–1708. doi:10.1590/S0103-50532011000900012.

ANNEXES

Les tableaux I-a à I-f ci-après représentent les propriétés physico-chimiques essentielles, les utilisations agricoles traditionnelles et les molécules de dégradation de ces douze phytosanitaires.

Ils ont été établis à partir des données du site <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/> puis Quick Links : PPDB ainsi que des rapports émis par la European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General ; Directorate E – Safety of the food chain, Unit E.3 – Chemicals, contaminants, pesticides : boscalid SANCO/3919/2007-rev.5 ; captane SANCO/10030/2006-rev.4 ; carbendazime SANCO/13063/2010 final ; chlorpyrifos SANCO/3059/99-rev.1.5 ; dithianon SANCO/10349/2011 final ; flonicamide SANCO/10479/2010 final ; fludioxonil SANCO/2818/07-rev.2 ; pirimicarbe SANCO/10529/05-rev.5 ; pyraclostrobine SANCO/1420/2001-Final ; thiaclopride SANCO/4347/2000-Final ; thiamethoxam SANCO/10390/2002-rev. final).

Nom	Boscalid	Captane	Carbendazime	Chlorpyrifos-Et
Nom CAS	2-chloro-N-(4'-chloro[1,1'-biphényl]-2-yl)-3-pyridinecarboxamide	3a,4,7,8-tetrahydro-2-(trichlorométhyl)thio-1H-isindole-1,3(2H)-dione	méthyl 1H-benzimidazol-2-ylcarbamate	O,O-diéthyl O-(3,5,6-trichloro-2-pyridinyl) phosphorothioate
Nom IUPAC	2-chloro-N-(4'-chlorobiphényl-2-yl)nicotinamide	N-(trichlorométhylthio)cyctohex-4-ene-1,2-dicarboximide	méthyl benzimidazol-2-ylcarbamate	O,O-diéthyl O-(3,5,6-trichloro-2-pyridyl) phosphorothioate
Smiles	CC2(C)CC1=C(C(=CC=C1)OC(NC)=O)O2	N1(C)C@H2CC=CC(C@H)2C1=O=O)S	COC(=O)NC1=NC2=CC=CC=C2N1	Clc1c(OP(=S)(OCC)OCC)nc(C)c(C)c1
Type	Fongicide	Fongicide, bactéricide	Fongicide, métabolite (dans le sol)*	Insecticide
Groupe	Carboxamide	Phthalimide	Benzimidazole	Organophosphate
Aspect	Poudre cristalline blanche	Poudre de couleur blanc sale	Poudre cristalline incolore	Cristaux blancs à bruns
Solubilité à 20°C (mg/L)	Eau	5,2	8	1,05
	Solvant 1	225000 in toluene	40 in hexane	4000000 in toluene
	Solvant 2	10000 in n-octanol	9000 in xylene	774000 in hexane
	Solvant 3	45000 in MeOH	4000 in MeOH	290000 in MeOH
Températures (°C)	Solvant 4	180000 in acetone	38000 in acetone	4000000 in Et acetate
	Fusion	143,3	174	41,5
Densité (g/mL)	se décompose avant	se décompose avant	se décompose avant	se décompose avant
	Décomposition	300	173	170
pKa à 25°C	1,381	1,68	1,45	1,51
	Aucune dissociation	Aucune dissociation	4,2 - base faible	Aucune dissociation
LogKow à pH7 à 20°C	2,96 - modéré	2,5 - faible	1,48 - faible	4,7 - élevé
	0,00072 - non volatil	0,0042 - non volatil	0,09 - non volatil	1,43 - volatil
Tension de surface (mN/m)	66	72,4 à 20°C	nc	nc
UV-Vis	λ (nm) / Abs. max (L/mol/cm)	λ (nm) / Abs. max (L/mol/cm)	λ (nm) / Abs. max (L/mol/cm)	λ (nm) / Abs. max (L/mol/cm)
	207 / 31534	243 / 312 (en solution neutre)	242,5-244 / 10410	202,7 >10 (abs. significative)
	228 / 19634	243 / 330 (en solution acide)	279-280,5 / 2 plus petites bandes	230 >10 (abs. significative)
	290 / 1529	296 / 195 (en solution basique)	285-288 / 14670	263,4 >10 (abs. significative)
Année	300 / 531	343 / 12,6 (en solution basique)		>290 / Pas de max.
	2002-2003	1952	1973-1974	1965
Cible	Contre de nombreux pathogènes fongiques / Botrytis spp., Alternaria spp., Sclerotinia spp. dans les fruits, légumes et plantes.	Fongicide dicarboximide largement utilisé dans les cultures horticoles comestibles et ornementales	Utilisé pour le contrôle de maladies / Septoria, Fusarium et Sclerotinia	Insecticide et acaricide organophosphoré, utilisé pour le contrôle des maladies du sol et du feuillage / Coleoptera, Diptera et Lepidoptera
Action	agent protecteur, absorption foliaire, déplace et inhibe la germination des spores et l'allongement du tube germinif	Non systémique, avec action préventive et curative	Systémique avec action préventive et curative. Inhibition de la mitose et de la division cellulaire	Non systémique, par contact et action dans l'estomac. Inhibiteur d'acétylcholinestérase (ACHE)
Présentation commerciale	Granules hydrosolubles, applicable en spray	Granules ou poudres mouillables, mélangées à l'eau et utilisables en spray	Concentré soluble qui est mélangé à l'eau et appliqué en spray. Utilisé en arrosage ou en trempage avant plantation	Concentré émulsifiable qui est mélangé à l'eau et appliqué en spray. Existe aussi en granules à déposer directement sur le sol.

Tableau I-a : Propriétés physico-chimiques et usages agricole du boscalid, captane, carbendazime et chlorpyrifos-éthyl

Nom		Boscalid	Captane	Carbendazime	Chlorpyrifos-Et
Dégradation aérobie dans le sol (jours)	DT50	246 (en labo à 20°C) et 118 (aux champs) - persistant	0,8 (en labo à 20°C) et 3,7 (aux champs) - non persistant	34,3 (en labo à 20°C) - persistance modérée et 22 (aux champs) - non persistant	76 (en labo à 20°C) - persistance modérée et 21 (aux champs) - non persistant
	DT90	442 (en labo à 20°C) et 365 (aux champs)	2,5 (en labo à 20°C)	132,5 (en labo à 20°C) et 115 (aux champs)	250 (en labo à 20°C) et 105 (aux champs)
Photolyse dans l'eau à pH7	DT50 (jrs)	30 - stable (n'est pas une voie de dégradation significative)	Stable	Stable de pH5 à pH7; de 22-124jrs à pH9	29, 6 - lent
Hydrolyse à 20°C à pH7	DT50 (jrs)	Stable de pH4 à pH9 - très persistant	Sensible au pH : 0,15jr à pH5 et 6min à pH9	>350 (persistant) à pH5 et pH7; de 54-124 à pH9, de 22 à 25°C	25,5 - non persistant; sensible au pH : 68jrs à pH5 et 23 jrs à pH8
Métabolites clés			Tetrahydrothialimide (formation dans sol)	2-aminobenzimidazole (formation dans sol), métabolite mineur	3,5,6-trichloro-2-pyridinol (formation dans sol), métabolite principal mais non pertinent
			Acide tetrahydrothialimique (formation dans sol)		
Autres métabolites connus			2-cyanocyclohex-4-ene carboxylic acid (formation dans sol)	5-hydroxymethylbenzimidazole carbamate (formation dans animal et plante)	O-Et-O-(3,5,6-trichloro-2-pyridil)-phosphorothioic acid (formation par hydrolyse)
			cyclohex-4-ene-1,2-dicarboxylic acid (formation dans eau)		
			3-hydroxy-4,5-cyclohexene-1,2-dicarboximide (formation dans animal)		
			5-hydroxy-4,5-cyclohexene-1,2-dicarboximide (formation dans animal)		
			4,5-epoxy-1,2-dicarboximide (formation dans animal et plante)		
			4,5-dihydroxy-1,2-dicarboximide (formation dans animal)		
			6-hydroxy-1-amido-2-carboxy-4,5-cyclohexene (formation dans animal)		
Molécule-mère (si métabolite)*				Thiophanate methyl (majoritairement)	
				Benomyl	

Tableau b : Rémanence et métabolites de dégradation du boscalid, captane, carbendazime et chlorpyrifos-éthyl

Nom	Dithianon	Fonicamid	Fludioxonil	Propargite
Nom CAS	5,10-dihydro-5,10-dioxonaphtho[2,3-b]-1,4-dithiin-2,3-dicarbonitrile	N-(cyanométhyl)-4-(trifluorométhyl)-3-pyridinecarboxamide	4-(2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-4-yl)-1H-pyrrole-3-carbonitrile	2-[4-(1,1-diméthylethyl)phénoxy]cyclohexyl 2-propynyl sulphite
Nom IUPAC	5,10-dihydro-5,10-dioxonaphtho[2,3-b]-1,4-dithiine-2,3-dicarbonitrile	N-cyanométhyl-4-(trifluorométhyl)nicotinamide	4-(2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-4-yl)-1H-pyrrole-3-carbonitrile	2-(4-tert-butylphénoxy)cyclohexyl prop-2-ynyl sulphite
Smiles	<chem>N#CC=C1SC2=C(C)(SC=C1C#N)C(=O)C3C(C2=O)CC3</chem>	<chem>O=C(NCC#N)C1=CC=CC=C1C(F)(F)F</chem>	<chem>N#CC3=CC=CC=C3C1=CC=CC=C1C(F)(F)F</chem>	<chem>O=S(=O)(C#C)OC2CC3CC2OC1CCC(C#C)C1C</chem>
Type	Fongicide	Insecticide, aphicide	Fongicide	Acaricide
Groupe	Quinone	Pyridine	Phénylpyrrole	Sulfite ester
Aspect	Cristaux bruns foncés, d'aspect fibreux	Poudre blanc cassé	Cristaux jaunes	Liquide visqueux brun-jaune foncé
Solubilité à 20°C (mg/L)	Eau	0,22 - faible	1,8	0,215 - faible
	Solvant 1	14700 in toluene	550 in toluene	200000 in toluene
	Solvant 2	8,77 in hexane	4500 in CH2Cl2	200000 in hexane
	Solvant 3	22200 in acetone	163500 in acetone	200000 in CH2Cl2
Solvant 4	10600 in Et acetate	34200 in Et acetate	190000 in acetone	200000 in acetone
Fusion	215	157,5	199,8	nc
Ebullition	nc	Se décompose avant	Se décompose avant	Se décompose avant
Décomposition	222	313	306	210
Densité (g/mL)	1,58	1,54	1,54	1,113
pKa à 25°C	Aucune dissociation	11,6 - base forte	0 (pKa1 base, pKa2 14,2 acide)	Aucune dissociation
LogKow à pH7 à 20°C	3,2 - élevé	-0,24 - faible	4,12 - élevé	5,7 - élevé
Pression de vapeur à 25°C (mPa)	10 ⁻⁷ - non volatil	9,43.10 ⁻⁴ - non volatil	3,9.10 ⁻⁴ - non volatil	0,00404 - non volatil
Tension de surface (mN/m)	72,7 à 20°C	47,3 à 25°C	47,7 - 48,5	nc
UV-Vis	λ (nm) (L/mol/cm) in ACN	λ (nm) (L/mol/cm)	λ (nm) (L/mol/cm)	λ (nm) (L/mol/cm)
	Abs. max (nm) à pH1,3	Abs. max (L/mol/cm)	Abs. max (L/mol/cm)	Abs. max (L/mol/cm)
	Abs. max (nm) à pH8,9	Abs. max (L/mol/cm)	Abs. max (L/mol/cm)	Abs. max (L/mol/cm)
	199 35932	199 18102	204 13200 en solution basique	265 12384 en solution neutre
233 20542	237 15110	265 3870 en solution neutre	266 12327 en solution acide	
291 6535	291 5100	266 3890 en solution acide	270 11790 en solution basique	
330 5083	342 4489	270 4190 en solution basique		
Année	1965	2000	1990-1993	1969
Cible	Fongicide dicarbonitrile pour le contrôle de la galle et d'autres maladies des feuilles / mildiou	Insecticide utilisé contre les pucerons, les parasites et la mouche blanche dans nombre de situations incluant les serres.	Fongicide utilisé dans le traitement des graines, pour le contrôle de certaines maladies / Fusarium, Rhizoctonia et Alternaria	Acaricide utilisé pour le contrôle des mites, dans divers champs, fruits, légumes et cultures ornementales.
Action	Agent protecteur avec quelque action curative	Systémique, sélectif avec une activité à long terme. Susceptible de perturber les mécanismes d'alimentation des insectes.	Non systémique, avec une activité résiduelle longue. Inhibe la phosphorylation associée au transport du glucose et réduit la croissance mycéliale.	Non systémique, avec une action de contact. Inhibe la phosphorylation oxydative.
Présentation commerciale	Concentré soluble ou granulés mouillables, qui sont mélangés à l'eau et appliqués en spray.	Granules mouillables qui sont mélangés à l'eau et appliqués en spray.	Concentré fluidifiable, qui est mélangé à l'eau et utilisé pour le traitement des graines.	Emulsion OW, qui est mélangé à l'eau et appliqué en spray

Tableau c : Propriétés physico-chimiques et usages agricoles du dithianon, fonicamid, fludioxonil et propargite

Nom		Dithianon	Fonicamid	Fludioxonil	Propargite
Dégradation aérobie dans le sol (jours)	DT50	10,5 (en labo à 20°C) - non persistant et 35 (aux champs) - persistance modérée	1,1 (en labo à 20°C) et 3,1 (aux champs) - non persistant	239 (en labo à 20°C) - persistant et 20,5 (aux champs) - non persistant	72,2 (en labo à 20°C) - persistance modérée et 16,7 (aux champs) - non persistant
	DT90	69,2 (en labo à 20°C)	3,5 (en labo à 20°C)	nc	301 (en labo à 20°C) et 262,7 (aux champs)
Photolyse dans l'eau à pH7		0,01 - rapide	Stable	10 - vitesse modérée	13,2 - vitesse modérée
Hydrolyse à 20°C à pH7		0,6 - non persistant; sensible au pH : 10,7 à pH5 et 9,8min à pH9 à 20°C. Complètement instable à pH>4 en milieu humide	Stable à pH4 et pH7, 204jrs à pH9, à 20°C - très persistant	Stable de pH5 à pH9 - très persistant	64,8 - persistance modérée; sensible au pH et à la température : stable à pH4; 64,8jrs à pH7 et 25°C; 8,4jrs à pH7 et 40°C; 1,1jrs à pH9 et 25°C; 0,2jrs à pH9 et 40°C
Métabolites clés			4-trifluorométhyl-nicotinic acid, métabolite principal et pertinent (formation dans sol)	3-carbamoyl-2-cyano-3-(2,2-difluorbenzo[1,3]-dioxol-4-yl)-oxirane-2-carboxylic acid, métabolite principal mais non pertinent (formation dans sol)	Tert-butylphenoxycyclohexanol, métabolite principal et pertinent (formation dans sol)
			N-(4-trifluorométhyl-nicotinoyl)glycinamide, métabolite principal et pertinent (formation dans sol)	(2,2-difluorbenzo[1,3]dioxol-4-yl)-4-carboxylic acid, métabolite principal mais non pertinent (formation dans sol)	
			6-hydroxy-4-trifluorométhyl-nicotinic acid, métabolite principal et pertinent (formation dans sol)		
		2-amino-1,4-naphthoquinone (dans les fécès des rats)	(dans les urines de rats, les plantes et les animaux)	2-cyano-3-(2,2-difluorbenzo[d][1,3]dioxol-4-yl)propanoic acid or 3-cyano-2-(2,2-difluorbenzo[d][1,3]dioxol-4-yl)propanoic acid (photolyse dans eau)	(dans les fécès des souris)
		Phthalic acid (dans le sol - photolyse anaérobie - et dans la plante)	(dans les urines de rats, les plantes et le sol)	4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-4-yl)-2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrole-3-carbonitrile (très mobile) (photolyse dans sol)	(chez les rats)
		Phthalaldehyde (hydrolyse, photolyse)	(dans les urines de rats)	2-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-4-yl)-2-hydroxy-acetamide (chez le rat)	(dans les urines et les fécès des rats, dans les plantes)
		1,2-benzenediméthanol (hydrolyse, photolyse)	(dans les urines de rats)	4-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-4-yl)-5-hydroxy-2-oxo-2,5-dihydro-1H-pyrole-3-carbonitrile (chez le rat)	(dans les urines et les fécès des rats)
Autres métabolites connus		Ref. CL 1017911 (hydrolyse)	(dans les urines de rats)	2-cyano-3-(2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxol-4-yl)-succinamic acid (photolyse dans eau)	(dans le sol)
		Ref. CL 1025 (dans le sol, anaérobie)			
		Ref. CL 153880 (dans le sol, anaérobie)			
		Ref. CL 231509 (dans la plante)			
		4,9-dioxo-4,9-dihydro-2,3-bithiophène-2,3-dicarbonitrile Ref. CL 902198 (dans les fécès de rats et dans la plante - aérobie)			
		Ref. CL 902200 (dans le sol - anaérobie et dans la plante)			
Molécule-mère (si métabolite)*					

Tableau d : Rémanence et métabolites de dégradation du dithianon, fonicamid, fludioxonil et propargite

Nom	Pyraclostrobrine	Pyrimicarbe	Thiaclopride	Thiamethoxam
Nom CAS	methyl [2-[[[1-(4-chlorophenyl)-1H-pyrazol-3-yl]oxy]methyl]phenyl]methoxycarbamate	2-(diméthylamino)-5,6-diméthyl-4-pyrimidinyl diméthylcarbamate	(Z)-[3-[(6-chloro-3-pyridinyl)methyl]-2-thiazolidinylidene]cyanamide	3-[(2-chloro-5-thiazolyl)methyl]tetrahydro-5-méthyl-N-nitro-4H-1,3,5-oxadiazin-4-imine
Nom IUPAC	methyl [2-[[1-(4-chlorophenyl)pyrazol-3-yl]oxy]methyl]phenylmethoxycarbamate	2-diméthylamino-5,6-diméthylpyrimidin-4-yl diméthylcarbamate	(Z)-3-[(6-chloro-3-pyridinylmethyl)-1,3-thiazolidin-2-ylidene]cyanamide	(EZ)-3-[(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl)-5-méthyl-1,3,5-oxadiazin-4-ylidene]nitro]amine
Smiles	O=C(OC)N(C)C1=CC=CC=C1C2=CC(=C)C=C2	O=C(OC)1nc(nc1C)N(C)C)N(C)C	C1=CN(C)C(=N)C=C1	C1=CN(C)C(=O)N(C)C=C1
Type	Fongicide	Insecticide	Insecticide, molluscicide	Insecticide
Groupe	Strobilurine	Carbamate	Neo-nicotinoïde	Neo-nicotinoïde
Aspect	Solide cristallin, blanc à beige clair	Solide blanc	Poudre cristalline blanche à beige	Poudre cristalline
Solubilité à 20°C (mg/L)	Eau	1,9 - faible	184 - modérée	4100 - élevée
	Solvant 1	3700 in heptane	235000 in xylene	680 in toluene
	Solvant 2	24200 in octanol	226000 in Et acetate	7000 in Et acetate
	Solvant 3	100800 in MeOH	250000 in MeOH	1 in hexane
Solvant 4	500000 in acetone	250000 in acetone	64000 in acetone	48000 in acetone
Fusion	64,5	91,6	136	139,1
Températures (°C)	Se décompose avant	nc	Se décompose avant	Se décompose avant
	Ebullition	200	nc	270
Décomposition	1,37	1,18	1,46	1,57
Densité (g/mL)	Aucune dissociation	4,4 - base faible	Aucune dissociation	Aucune dissociation
pKa à 25°C	3,99 - élevé	1,7 - faible	1,26 - faible	-0,13 - faible
LogKow à pH7 à 20°C	2,60.10 ⁻⁵ - non volatil	0,43 - non volatil	3.10 ⁻⁷ - non volatil	6.6.10 ⁻⁶ - non volatil
Pression de vapeur à 25°C (mPa)	nc	58,2 à 20°C	nc	nc
Tension de surface (mN/m)				
UV-Vis	λ (nm) / Abs. max (L/mol/cm)		λ (nm) / Abs. max (L/mol/cm)	λ (nm) / Abs. max (L/mol/cm)
		205 / 2500	218,8 / 5760	255
		275 / 2400	244,7 / 20900	
			272,4 / 855	290-750 / Pas de max d'absorbance
		313,5 / 3800		
Année	2000	1969-1970	1999, 2003	1991, 1997
Cible	Fongicide utilisé pour le contrôle des principaux pathogènes des plantes / Septoria tritici, Puccinia spp. et Pyrenophora teres.	Insecticide utilisé pour le contrôle des pucerons dans une très large variété de cultures	Insecticide chloronitroyle, utilisé sur les pommes et autres cultures pour le contrôle des insectes masticateurs et suceurs.	Insecticide utilisé pour le contrôle d'une large variété de maladias / pucerons, mouches blanches, parasites, cochenilles, taupins, scarabées
Action	Action protectrice et curative. Inhibiteur de la respiration	Sélectif et systémique, avec une action de contact, par ingestion dans l'estomac et par inhalation au niveau de l'appareil respiratoire. Inhibiteur d'acétylcholinestérase (ACHE).	Action de contact et par ingestion dans l'estomac, avec og propriétés systémiques. Agoniste des récepteurs d'acétylcholine (nAChR).	Large spectre, systémique, action par contact, par ingestion dans l'estomac. Agoniste des récepteurs d'acétylcholine (nAChR).
Présentation commerciale	Concentré émulsifiable, qui est mélangé à l'eau et appliqué en spray	Granules mouillables, qui sont mélangées à l'eau et appliquées en spray. Disponible sous de nombreuses autres formulations.	Dispersion dans huile, concentrés solubles et granulés.	Formulations incluant des concentrés fluidifiables pour le traitement des graines, des concentrés dispersibles dans l'eau et des concentrés en suspension.

Tableau e : Propriétés physico-chimiques et usages agricoles de la pyraclostrobrine, pyrimicarbe, thiaclopride et thiamethoxam

Nom		Pyraclostrobine	Pyrimicarbe	Thiaclopride	Thiamethoxam
Dégradation aérobie dans le sol (jours)	DT50	62 (en labo à 20°C) et 32 (aux champs) - persistance modérée	86 (en labo à 20°C) - persistance modérée et 9 (aux champs) - non persistant	1,3 (en labo à 20°C) et 18 (aux champs) - non persistant	121 (en labo à 20°C) - persistant et 39 (aux champs) - persistance modérée
	DT90	153 (en labo à 20°C) et 157 (aux champs)	314 (en labo à 20°C) et 86 (aux champs)	8,9 (en labo à 20°C) et 45 (aux champs)	459 (en labo à 20°C) et 296,5 (aux champs)
Photolyse dans l'eau à pH7		1,7 - vitesse modérée	6 - vitesse modérée	Stable	2,7 - vitesse modérée
Hydrolyse à 20°C à pH7		Stable de pH5 à pH9 à 25°C - très persistant	Stable de pH5 à pH9 à 25°C après 32jrs - très persistant	Stable de pH5 à pH9 - très persistant	Stable - Très persistant, sensible au pH : stable de pH1 à pH7, 11, 5jrs à pH9, à 20°C
Métabolites clés		1-(4-chlorophenyl)-3-((2[(methoxycarbonylamino)benzoyloxy]-1H-pyrazol-3-yl)glucopyranosiduronic acid, métabolite principal et pertinent (formation dans sol)	2-diméthylamino-5,6-diméthylpyrimidin-4-ol, métabolite principal et pertinent (formation dans sol)	Thiacloprid amide ou (3-[(6-chloro-3-pyridinyl)méthyl]-2-thiazolidinylidène) urea, métabolite principal et pertinent (formation dans sol)	Clofanidim (CAS 210880-92-5), métabolite principal et pertinent (formation dans sol)
		Méthyl-N-(2[[1-(4-chlorophenyl)-1H-pyrazol-3-yl]oxyméthyl]phényl)carbamate, métabolite principal et pertinent (formation dans sol)	5,6-diméthyl-2-(méthylamino)pyrimidin-4-ol, métabolite principal et pertinent (formation dans sol)	Thiacloprid sulfonic acid ou sodium 2-[[[(aminocarbonylamino)-carbonyl]([6-chloro-3-pyridinyl)-méthyl]amino]éthanesulfonate, métabolite principal et pertinent (formation dans sol)	
			5,6-diméthyl-2-(méthylformamido)pyrimidin-4-yl-diméthylcarbamate, métabolite principal et pertinent (formation dans sol)		
Autres métabolites connus		Ref: BF500-11 (dans les sédiments et l'eau)	1,1-diméthylguanidine (par photolyse dans le sol)		Ref: CGA 355190 (formation aérobie dans le sol)
		Ref: BF500-13 (dans les sédiments et l'eau)	5,6-diméthyl-2-(méthylamino)pyrimidin-4-yl diméthylcarbamate (polluant potentiel des eaux souterraines) (anaérobie, par photolyse dans le sol)		Ref: NOA 407475 (formation anaérobie dans le sol)
		Ref: BF500-14 (dans les sédiments et l'eau)	2-amino-5,6-diméthylpyrimidin-4-yl diméthylcarbamate (dans les plantes et le sol)		Ref: NOA 459602 (polluant potentiel des eaux souterraines) (dans le sol)
		Ref: BF500-16 (chez l'animal)			Ref: SYN 501406 (polluant potentiel des eaux souterraines) (dans le sol)
		méthyl-N-[[[1-(4-chlorophenyl)-pyrazol-3-yl]oxy]-o-tolyl]carbamate (dans le sol - anaérobie, photolyse dans l'eau, chez le rat, les animaux et les plantes)			
		1-(4-chlorophenyl)-1H-pyrazol-3-ol (chez le rat, les animaux et les plantes)			
		Ref: BF500-6 (photolyse dans l'eau, chez les animaux)			
		1-(4-chloro-2-hydroxyphényl)-1H-pyrazol-3-ol (chez les animaux)			
Molécule-mère (si métabolite)*					

Tableau f : Rémanence et métabolites de dégradation de la pyraclostrobine, pyrimicarbe, thiaclopride et thiamethoxam

CHAPITRE II

*Composition des épidermes de pommes
et structure des lipides cuticulaires.
Propriétés cristallines et amorphes des
cires et des cuticules.
Interactions molécule active - cuticule*

Chapitre II Etude de la composition des épidermes de pommes et de la structure des lipides cuticulaires. Propriétés cristallines et amorphes des cires et des cuticules. Etude des interactions molécule active - cuticule

Mots-clés : pomme, cuticule, caractérisation chimique, caractérisation organisationnelle

Résumé :

La pomme, *Malus domestica*, est le troisième fruit le plus consommé dans le monde après les agrumes et la banane. C'est aussi le fruit préféré des Français. Sur les 70 millions de tonnes produits annuellement, environ 1,7 millions sont produits par la France. L'enjeu économique est élevé et la productivité est assurée moyennant une lutte efficace de tous les instants contre les nuisibles. En France, c'est une des cultures les plus traitées avec des indices de fréquence de traitement de l'ordre de 36.

Sur le plan physiologique, tous les végétaux sont recouverts d'une couche externe appelée cuticule, qui joue le rôle d'une barrière physico-chimique et protège les cellules contre le biotope. C'est une membrane lipidique complexe, hydrophobe dont la composition chimique et la structure ont été largement étudiées. En bref, il s'agit d'un biopolymère tridimensionnel amorphe (cutine) englué dans des cires (amorphes et cristallines) qui lui confèrent un caractère semi-cristallin. Pour autant, l'organisation structurale des molécules de cires et du polymère de cutine n'a toujours pas été totalement élucidée et peu de modèles existent.

La présente étude a pour objectif d'établir une base de données réunissant suffisamment d'informations en termes de caractérisations physico-chimiques et structurales afin d'accéder à une meilleure compréhension des phénomènes régissant les interactions entre cuticules et molécules de phytosanitaires, en particulier la rétention et la désorption de ces dernières.

1. Introduction

La pomme fait partie des fruits à pépins le plus consommé dans le monde après les agrumes (Cf. § I- 1. 1.). En Midi-Pyrénées, sa culture est très étendue et couvre 32 % des surfaces agricoles dédiées aux vergers et vignes (raisins de table). En 2013, la production a atteint 276.510 tonnes (soit 78 % des fruits produits) et chute à 252.500 tonnes en 2014 en raison d'une forte altération de certaines variétés (Golden et Braeburn). En 2015, la production remonte à 329.438 tonnes (soit 59 % des fruits produits) et correspond à la réunion des deux anciennes régions Midi-Pyrénées et Languedoc-Roussillon. Ces chiffres représentent entre 14 et 16 % de la production nationale, ce qui positionne la région au rang de premier producteur du Sud-Ouest et au second rang national après la région Provence Alpes Cote d'Azur (Cf. § I- 1. 1. (Guiavarch 2015 [1], Chambres d'Agriculture Midi-Pyrénées – Languedoc Roussillon 2016 [2] et de de Midi-Pyrénées 2015 [3]).

Il existe quelques milliers de variétés de pommes, appelées cultivars (emprunté à l'anglais pour désigner les *CULTivated VARIeties* et utilisé dans le Code International pour la nomenclature des plantes cultivées), parmi lesquels, la région Midi-Pyrénées en exploite une dizaine. Dans ces travaux, trois variétés ont été plus particulièrement étudiées : Gala, Fuji et Pink Lady®. Les pommes Gala sont précoces (Août) et leur culture est productive. En 2007, elles étaient en tête avec 26 % des surfaces de vergers de pommiers cultivés en Midi-Pyrénées (Agreste 2008 [4]). Pour la saison 2014-2015, elles dominent le marché. La Fuji est une variété plus tardive (Octobre). En 2014-2015, le Sud-Ouest est le premier producteur de Fuji en France. Quant à la Pink Lady®, elle est récoltée en fin d'année (Novembre). C'est une variété fortement soumise au marketing, qui défend une production maîtrisée et très organisée (producteurs, pépiniéristes éditeurs, distributeurs agréés...). Un site internet lui est même consacré (www.pomme-pinklady.com, consulté le 31 Juillet 2016). Sur ce site, les résultats d'une étude Shopper réalisée en France, Italie et Espagne entre 2009 et 2011 montrent que plus de 70 % des consommateurs français et espagnols et plus de 80 % des consommateurs italiens estiment que les propriétés organoleptiques de la Pink Lady® sont supérieures à celles des autres variétés de pommes.

D'un point de vue botanique, le fruit se compose de quatre parties distinctes : (i) l'épiderme (peau), (ii) le réceptacle charnu (chair), (iii) le péricarpe (cœur) et (iv) l'endocarpe (trognon) (Cf. § I- 1. 3. et Figure I- 4.). D'un point de vue chimique, la composition de chaque partie n'est pas identique (Cf. § I- 1. 5.). La plupart des études sur la composition chimique des pommes concernent le fruit entier avec ou sans la peau. Dans nos travaux, nous nous sommes intéressés à l'épiderme puis plus spécifiquement à la cuticule, membrane complexe extracellulaire la plus externe du fruit, qui joue un rôle de barrière avec le biotope et qui est le siège de toutes les interactions. Elle est essentiellement composée de lipides : cires cuticulaires, cutine et cutane (Cf. §I- 2. 2.) (Pollard *et al.* 2008 [5], Baker *et al.* 1982 [6], Konarska 2012 [7]). Les cires épicuticulaires se répartissent sur la face externe de la cuticule tandis que les cires intracuticulaires imprègnent le polymère de cutine/cutane (Barthlott *et al.* 1998 [8], Buschhaus et Jetter 2011 [9]). Les couches cuticulaires les plus internes, celles adjacentes aux cellules de l'épiderme contiennent également des polysaccharides pariétaux (Pollard *et al.* 2008 [5], Garrec *et al.* 1995 [10]). Etant donné que la compréhension des phénomènes de transport et d'échanges à cette interface passe par la connaissance approfondie de sa composition chimique mais surtout de son architecture, nous nous sommes attachés à caractériser l'épiderme et la cuticule des trois variétés de pommes. Les résultats des caractérisations physico-chimiques de l'épiderme et de la cuticule dépendent de la quantité d'épiderme, d'hypoderme et/ou de chair résiduelle dans l'échantillon et par conséquent de sa méthode de préparation (Cf. § I- 2. 3.).

Sur la base des éléments fournis par la littérature, afin d'identifier les lipides cuticulaires et par conséquent la teneur en lipides de l'épiderme, nous avons pelé les pommes et éliminé le maximum de composés autres que les lipides (polysaccharides pariétaux, lignine, protéines, polyphénols...) par un traitement enzymatique, avant de procéder à leur caractérisation physico-chimique (méthodes spectroscopiques - IRTF, RMN, UV..., chromatographiques - CPG/DIF, CPG/SM, CCMHP/UV, CIHP..., et autres - gravimétrie, ADF/NDF, Kjeldhal...).

Sur le plan structural, sachant que dans la cuticule – solide semi-cristallin ponctué de régions amorphes – la nature et la quantité de structures cristallines définissent la tortuosité du chemin de diffusion apolaire, nous avons étudié le caractère amorphe/cristallin des différents lipides de l'épiderme (cuticules entières, cires et cuticules décirées) des trois variétés de pommes par RX, DSC, et RMN du ^{13}C solide. Dans la littérature, de nombreux paramètres physiques tels que la sorption, la diffusion, la perméabilité, la tortuosité... sont évaluées pour donner une représentation structurale mais théorique du polymère. Il n'existe aucune représentation 3D qui aiderait à modéliser les phénomènes de pénétration et de transfert de toutes les molécules organiques non chargées y compris l'eau vers le compartiment de sorption (= parois cellulaires et espaces intercellulaires de l'épiderme) (Cf. § I- 2. 5.). Nous avons donc étudié l'architecture des cuticules entière et décirée des trois variétés de pommes par MEB dans le but de proposer, dans la suite des travaux, un schéma de sorption-diffusion-désorption des contaminants organiques à caractère hydrophobe, plus spécifiquement des molécules de phytosanitaires. Les produits phytosanitaires de traitement (PPT) sont spécialement formulés pour être solubles dans l'eau tandis que les molécules actives ont une affinité prononcée pour la cuticule. Ils sont appliqués dans un but précis de gestion des risques pour optimiser la productivité et assurer la conservation jusqu'à la commercialisation. Mais une fois intégrés dans la cuticule, la plupart des résidus présente une rémanence plus ou moins prononcée. La région Midi-Pyrénées emploie une trentaine de produits phytosanitaires de traitement, essentiellement insecticides et fongicides (Cf. Tableau I-10). Afin de compléter les données pour une représentation modélisée des différentes espèces en interaction dans la cuticule, nous avons étudié par RMN du solide la dynamique moléculaire d'un produit phytosanitaire dans la cuticule des pommes Fuji. Parmi les traitements de conservation contre le développement de la tavelure en champs et en chambre froide, le fludioxonil a été sélectionné pour sa fréquence et son niveau de détection sur les pommes mais aussi parce que les propriétés de la molécule la rendent aisément analysable, en particulier par chromatographie en phase gazeuse.

2. Matériels et méthodes

2. 1. Sélection des variétés de pommes

Les trois variétés de pommes utilisées dans cette étude seront dénommées ci-après : Gala = VAR1, Fuji = VAR2 et Pink Lady® = VAR3 (Tableau II-1). Outre le fait qu'elles sont issues de trois variétés différentes, elles sont récoltées à différentes saisons : Août, Octobre et Novembre respectivement. Elles ne courent pas, par conséquent, les mêmes risques face aux agresseurs (tavelure...) et ne subissent pas les mêmes cycles de traitement. Une fois récoltées, les pommes sont conservées en chambre climatique, pré-calibrées puis conservées en chambre froide jusqu'à échantillonnage.

Variété	Gala	Fuji	Pink Lady®
Code	VAR1	VAR2	VAR3
Calibre massique (nombre de pommes pour 18,2kg)	100	125	113
Diamètre (mm)	65-70	70-75	70-75

Tableau II-1 : Caractéristiques des variétés de pommes

2. 2. Echantillonnage des épidermes

Les pommes de chaque variété sont pelées sur moins de 2 mm d'épaisseur au moyen d'un épluche-pomme mécanique (Figure II-1).



Figure II-1 : Echantillonnage des épidermes au moyen d'un épluche-pomme mécanique

Deux séries d'échantillonnage ont été nécessaires : l'un pour la caractérisation des lipides et l'autre pour les autres caractérisations chimiques (glucides, minéraux, fibres...) (Tableau II-2).

Variété	VAR1	VAR2	VAR3
CARACTERISATION DES LIPIDES			
Masse pommes (kg)	49,380	47,300	38,900
Nombre de pommes	354	324	244
Masse peaux humides (kg)	5,150	3,630	3,845
AUTRES CARACTERISATIONS			
Masse pommes (kg)	3,475	2,360	2,070
Nombre de pommes	19	16	13
Masse peaux humides (g)	278,25	156,88	157,70

Tableau II-2 : Echantillonnage des épidermes de pommes pour caractérisations

Pour la caractérisation des lipides, les épidermes sont soumis à une lyse enzymatique à $25 \pm 5^\circ\text{C}$ pendant 24 heures. La solution tampon citrate 20 mmol/L à pH 4 contient environ 16000 U/L de cellulase et 23600 U/L de pectinase. L'acide citrique anhydre, le citrate de sodium dihydraté ($\geq 99\%$), la cellulase C9748 (*Trichoderma longibrachiatum* $\geq 1,0$ U/mg) et la pectinase (*Aspergillus aculeatus*, solution aqueuse ≥ 3800 U/L) sont fournis par Sigma Aldrich.

Tous les échantillons de peaux, lysés ou non, sont ensuite congelés à -40° à $-5^\circ\text{C}/\text{min}$ puis lyophilisés sous un vide de 30 Pa dans un lyophilisateur Cryoivoire PILOT 27 1,25 m³ (CryoNext). Ils sont finalement broyés dans un moulin électrique en acier inox.

2. 3. Caractérisations physico-chimiques des épidermes

2. 3. 1. Taux de matière sèche

Le taux de matière sèche des pommes (n = 2) et des peaux de pommes (n = 28) est évalué par différence gravimétrique d'une prise d'essai d'échantillon représentative avant et après séchage à l'étuve à 105°C pendant 24 heures.

2. 3. 2. Taux de matières minérales

Le taux de matières minérales des peaux de pommes est évalué par différence gravimétrique d'une prise d'essai d'échantillon représentative avant et après minéralisation dans un four de calcination P330 de Nabertherm (Allemagne) à 550°C pendant 6 heures (n = 2).

2. 3. 3. Taux de protéines

La teneur en azote total Kjeldhal NTK a été mesurée sur l'appareil Kjeldhal 8400 de FOSS. Une prise d'essai représentative de peaux de pommes est minéralisée puis distillée selon la norme NF V 18-100 d'Octobre 1977 (n = 3). Le taux de protéines est calculé selon l'équation (1) :

$$\% \text{ protéines} = \% \text{ NTK} \times 6,25 \quad (1)$$

2. 3. 4. Taux de fibres (Cellulose, hémicelluloses, lignines)

Les dosages *Acid Detergent Fiber – Neutral Detergent Fiber* (ADF-NDF) appliqués à la matière végétale répondent à la méthode de Van Soest & Wine (Van Soest et Wine 1968 [11]). Elle permet d'obtenir une estimation des trois composés pariétaux chez les végétaux : lignines (L), cellulose (C) et hémicelluloses (Hc). Le dosage s'effectue en deux temps :

- les échantillons sont soumis à une attaque neutre qui permet de solubiliser les pectines, les protéines, les sucres, les matières minérales et les lipides solubles. Le résidu obtenu contient L + C + Hc ;
- les échantillons sont soumis à une première attaque acide qui solubilise les hémicelluloses. Le résidu L + C est alors soumis à une deuxième attaque oxydante qui élimine les lignines. Le résidu final correspond au taux de cellulose C.

Par différence, les taux de lignines et d'hémicellulose peuvent alors être calculés.

Les dosages ADF-NDF (n = 2) sont effectués au moyen d'un Fibertec system M – Hot extractor pour l'attaque ADF et Cold extractor pour l'attaque NDF (FOSS).

2. 3. 5. Taux d'extractibles à l'éthanol (Pectines)

Une prise d'essai de 500 à 600 mg de peaux de pommes (n = 2) est pesée dans un fritté de Fibertec (FOSS). Les échantillons sont lavés dans 100 mL d'éthanol 95° à ébullition puis rincés par de l'éthanol 80°. Les frittés sont déposés à l'étuve à 103°C pendant une nuit. Les résidus sont extraits par deux fois 100 mL d'acide chlorhydrique à 0,05 N à ébullition pendant 30 minutes. La filtration et le rinçage sont des étapes quantitatives pour chaque échantillon : les fractions sont collectées dans des flacons de

500 mL puis transvasés dans des fioles jaugées de 1 L dans lesquelles les volumes sont ajustés avec de l'eau déminéralisée.

Le taux de pectines totales peut être estimé par l'équation (2).

$$\text{Taux pectines totales (\%)} = \% \text{ extractibles éthanol} - \% \text{ extractibles HCl} \quad (2)$$

La teneur en acide galacturonique des pectines extraites des peaux de pommes est évaluée selon la méthode spectrophotométrique de Blumenkrantz. Une gamme étalon d'acide galacturonique est préparée entre 0 et 100 mg/L dans l'eau. Les échantillons sont préparés en duplicat. Il y a donc quatre analyses par échantillons de peaux.

L'acide galacturonique (99 %) est commercialisé chez Fluka. L'éthanol (95 %) et l'acide chlorhydrique (37 %) sont fournis par Sigma Aldrich.

2. 3. 6. Taux d'hydrosolubles à 20°C (Sucres simples et acides organiques)

Les extractibles à l'eau obtenus à 20°C sont destinés à mesurer uniquement les teneurs en sucres simples et acides organiques.

550 mg de peaux de pommes (n = 3) sont extraits par 40mL d'eau UHQ dans un tube de centrifugation FALCON de 50 mL pendant 1 heure à 20°C sous agitation orbitale (100 tours/min). Les tubes sont ensuite centrifugés 5 minutes à 3000 g. Le surnageant est filtré sur un kit de filtration Whatman muni d'un filtre en microfibre de verre de porosité 1,6 µm (N) 691, VWR, France). Le volume de filtrat est ajusté à 50 mL d'eau UHQ dans une fiole jaugée. La solution est diluée au vingtième dans de l'eau UHQ contenant 200 mg/L de fucose comme étalon interne pour le dosage des sucres simples. Environ 8 mL sont filtrés sur filtre seringue en acétate de cellulose 0,45 µm (Restek, Chine). Les 8 mL sont répartis dans 2 vials pour dosage des sucres simples et des acides organiques.

Les sucres simples sont analysés par chromatographie ionique haute performance (CIHP) au moyen d'un chromatographe ICS 3000_1 (DIONEX) équipé d'un détecteur à ampérométrie pulsée EDEt 1 (DIONEX) et muni d'une colonne PA1 (4 x 250 mm) et d'une pré-colonne CarboPac (4 x 50 mm) (DIONEX). Le débit de l'éluant *Eluent Generator* KOH (DIONEX) est fixé à 1 mL/min. Le gradient de concentration est le suivant : 2 mmol/L pendant 35 minutes, puis de 2 à 10 mmol/L en 5 minutes et enfin de 10 à 100 mmol/L en 2 minutes. Les données sont acquises grâce au logiciel Chromeleon 6.6 (DIONEX). Les sucres simples sont quantifiés à partir d'un étalonnage interne. Une gamme étalon de monosaccharides (fructose, glucose, saccharose et sorbitol) est préparé entre 0,1 et 100 mg/L d'eau UHQ contenant 200 mg/L de fucose en étalon interne.

Les acides organiques sont analysés par CIHP sur un chromatographe ICS 2000 (DIONEX) équipé d'un détecteur conductimétrique (ASRS ULTRA II 4mm, DIONEX) après suppression anionique, soumis à un courant de 248 mA. La colonne est une IonPac AS11-HC (4 x 250mm) et d'une pré-colonne AG11-HC (4 x 50mm) (DIONEX). Le débit de l'éluant *Eluent Generator* KOH est fixé à 1 mL/min. Le gradient de concentration est le suivant : 1 mmol/L pendant 8 minutes puis de 1 à 30 mol/L en 22 minutes et enfin 100 mmol/L pendant 10 minutes. Les données sont acquises au moyen du logiciel Chromeleon 6.6 (DIONEX). Les acides organiques sont quantifiés à partir d'un étalonnage externe. Une gamme étalon d'acides organiques (acides malique et citrique) est préparée entre 0,1 et 100 mg/L d'eau UHQ.

Les étalons de fructose (99 %), glucose (96 %) et de saccharose (99 %), sorbitol (97 %) et fucose (99 %) sont fournis respectivement par Aldrich et Sigma. L'acide malique (99 %) et l'acide citrique anhydre (99 %) sont respectivement fournis par Acros Organics et Sigma.

2. 4. Fractionnement et caractérisation des lipides cuticulaires

2. 4. 1. Quantification des cires cuticulaires totales

Environ 100 g de cuticules (épidermes après lyse enzymatique cf. § 2. 2.) lyophilisées et broyées sont décirées dans un Soxhlet avec 1,5 L d'un mélange chloroforme/méthanol (50:50, V/V). Après quatre cycles complets, soit entre 7 et 8 heures, les cuticules décirées sont séchées à l'air libre et l'extrait solvant des cires est évaporé à sec à 45°C sous vide. Les cires sont réduites en poudre pour caractérisations. Le taux de cire dans la cuticule est calculé selon l'équation (3).

$$\text{Taux cires totales (\%)} = 100 * \frac{\text{Masse cires extraites (g)}}{\text{Masse cuticules lyophilisées (g)}} \quad (3)$$

Le taux de cire dans les pommes est généralement exprimé en mg/cm² dans l'équation (4).

$$\text{Taux cires totales (\%)} = 100 * \frac{\text{Masse cires extraites (mg)}}{\text{Surface pomme (cm2)*nombre pommes / extraction}} \quad (4)$$

2. 4. 2. Quantification de la cutine et du cutane

Les cuticules décirées sont soumises à une hydrolyse acide HCl 6 mol/L à 100°C sous reflux pendant 6 heures. Le résidu après hydrolyse est filtré sur papier fibre de verre Durieux préalablement taré et séché à l'étuve à 105°C. Le résidu est lavé jusqu'à pH neutre. Les filtres et leur résidu sont déposés à l'étuve à 105°C pendant 24 heures puis pesés de nouveau. Le taux de cutine + cutane est évalué selon l'équation (5).

$$\text{Taux cutine + cutane (\%)} = 100 * \frac{\text{Masse résidu sec après hydrolyse (g)}}{\text{Masse de la prise d'essai de cuticules lyophilisées (g)}} \quad (5)$$

Le résidu après hydrolyse est repris dans une solution de potasse à 1 % (M/V) dans le méthanol pour une saponification de 3 heures à 70°C sous reflux et agitation. L'ultime résidu après hydrolyse + saponification est filtré sur papier fibre de verre Durieux préalablement taré et séché à l'étuve à 105°C. Le résidu est lavé jusqu'à pH neutre. Les filtres et leur résidu sont déposés à l'étuve à 105°C pendant 24 heures puis pesés de nouveau. Le taux de cutane est évalué selon l'équation (6).

$$\text{Taux cutane (\%)} = 100 * \frac{\text{Masse résidu sec après hydrolyse et saponification (g)}}{\text{Masse de la prise d'essai de cuticules lyophilisées (g)}} \quad (6)$$

Le taux de cutine est donc obtenu par différence entre les équations (5) et (6).

Le chloroforme (Chromasolv®Plus for HPLC ≥ 99,9 %), le méthanol (Chromasolv® for HPLC ≥ 99,9 %), l'acide chlorhydrique (ACS Reagent, 37 %) et l'hydroxyde de potassium (Reagent grade, 90 %, flakes) sont fournis par Sigma Aldrich. Les filtres en fibre de verre Durieux N°28 ont été achetés chez Prolabo.

2. 5. Extractions mécaniques des cires cuticulaires

2. 5. 1. *Extraction par friction de la surface des pommes*

Six pommes de la variété 2 sont rincées sous un courant d'eau puis séchées. La surface est grattée au moyen d'un treillis métallique souple. L'ensemble des surfaces est frictionné trois fois. Les cristaux de cires et la grille sont récupérés dans un cristallisateur et immergés pendant une heure dans 200 mL de chloroforme. Le solvant est ensuite évaporé sous vide à 45°C. Les cires sont analysées par IRTF puis reprises dans du THF à environ 0,5 g/L pour être analysées par CCMHP/UV visible.

2. 5. 2. *Extraction par un film de gomme arabique*

Six pommes de la variété 2 sont rincées sous un courant d'eau froide puis séchées. La surface est recouverte au pinceau d'une solution de gomme arabique à 55 % dans l'eau. Les films sont retirés après séchage complet puis immergés dans 200 mL de chloroforme et de méthanol (1:1, V/V). Les films sont agités dans la solution pendant 30 minutes. Le mélange solvants + cires est ensuite évaporé sous vide à 45°C. Les cristaux sont analysés par IRTF puis repris dans du THF à environ 10 g/L pour être analysés par CCMHP/UV visible.

2. 5. 3. *Extraction par cryo-adhésion dans du glycérol*

Deux pommes de la variété 2 sont rincées sous un courant d'eau puis séchées. La surface est découpée en carré de 1 cm x 1 cm de côté. Une goutte de glycérol est déposée sur la lame d'un couteau. Un carré de peau, face externe, est délicatement déposé à la surface de la goutte. La lame est ensuite immergée dans de l'azote liquide jusqu'à congélation du glycérol et de la peau. La peau est décollée du glycérol encore congelé au moyen d'une pince : le glycérol et les cires épicuticulaires restent sur la lame du couteau. La goutte est ensuite dissoute dans un bécher de 200 mL d'eau distillée. L'extraction est répétée sur 10 carrés de peau. Une extraction liquide-liquide de l'eau par 500 mL de chloroforme permet de récupérer les cires cuticulaires. Le solvant est finalement évaporé sous vide. Les cristaux de cires sont analysés par IRTF puis re-dissous dans le chloroforme à environ 0,5 g/L pour analyse par CCMHP/UV visible.

2. 6. Extractions séquencées des cires cuticulaires sur pommes entières

Le principe de l'extraction séquencée des cires consiste à tremper à $20 \pm 5^\circ\text{C}$ un nombre de pommes défini dans un volume de solvant dont la polarité est croissante : hexane < chloroforme < méthanol. Entre 5 et 6 pommes de la variété 2 sont pesées et calibrées. Après optimisation*, les extraits sont réalisés comme indiqué ci-après :

- Extraction à l'hexane : les pommes sont immergées dans 1,2 L d'hexane pendant 15 minutes ; elles sont ensuite égouttées pendant 5 minutes. Au total, 5 cycles d'extraction sont réalisés puis les pommes sont rincées avec environ 100 mL d'hexane avant l'extraction au chloroforme. Les extraits sont identifiés sous : HEX-VAR1, HEX-VAR2 et HEX-VAR3.
- Extraction au chloroforme : les pommes sont immergées dans 1,5 L de chloroforme pendant 30 minutes ; elles sont ensuite égouttées pendant 5 minutes. Au total, 4 cycles d'extraction sont réalisés puis les pommes sont rincées avec environ 100 mL de chloroforme avant

l'extraction au méthanol. Les extraits sont identifiés sous : CHCl₃-VAR1, CHCl₃-VAR2, CHCl₃-VAR3.

- Extraction au méthanol : les pommes sont immergées dans 1,2 L de méthanol pendant 30 minutes ; elles sont ensuite égouttées pendant 5 minutes. Au total, 2 cycles d'extraction sont réalisés puis les pommes sont rincées avec environ 100 mL de méthanol avant d'être jetées. Les extraits sont identifiés sous : MeOH-VAR1, MeOH-VAR2, MeOH-VAR3.

Afin d'évaluer un rendement d'extraction dans chaque solvant pour chaque variété, trois séries d'extractions ont été réalisées sur 5-6 fruits préalablement pesés et calibrés. Une fois enrichis par les 3 séries d'extractions de 5-6 pommes, les extraits solvants sont évaporés à sec sous vide à 45°C.

* L'Optimisation des conditions d'extraction des cires sur pommes entières a fait l'objet d'une pré-étude. La durée et le nombre d'immersions dans chaque solvant ont été optimisés dans le but d'obtenir une extraction à épuisement de chaque catégorie de composés des cires cuticulaires. La chromatographie sur couche mince haute performance CCMHP/UV visible a été utilisée pour le suivi de la composition des extraits.

2. 7. Caractérisations physico-chimiques des lipides cuticulaires

2. 7. 1. Analyse de la surface des cires épicuticulaires

a- Analyse par cryo-microscopie à balayage

L'épiderme des fruits a été examiné sur un microscope électronique à balayage FEI Quanta 250 FEG (FEI Company, Eindhoven, Hollande / CMEAB, Plateforme Genotoul, Faculté de Médecine de Toulouse). Un échantillon de 1 cm de diamètre est prélevé au scalpel et collé sur un plot au moyen d'un adhésif double face *Tissue-Tek* ou de colle de montage à base de graphite colloïdal. Il est ensuite cryo-fixé dans de l'azote pâteux à - 220°C sous vide pendant quelques secondes. L'échantillon congelé est transféré sous vide dans le module de cryo-chambre (Quorum PP3000T Cryo Transfer System) à - 140°C. La température est ensuite remontée et maintenue à - 95°C pour la sublimation (30 à 60 minutes). L'échantillon est métallisé au platine (60 sec, 10 mA) puis introduit dans la chambre du microscope où il est maintenu à - 140°C le temps de l'observation (5 à 10 kV) (Figure II-2).

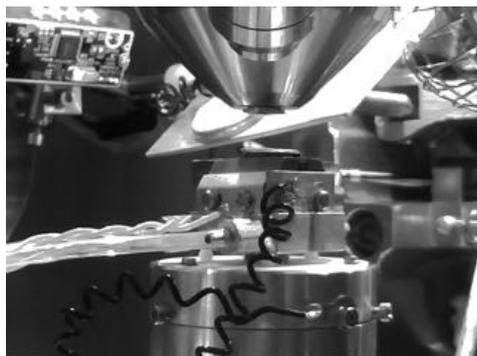


Figure II-2 : Platine cryo du microscope à balayage FEI Quanta 250 FEG

b- Evaluation de la mouillabilité de surface

Les angles de contact d'une goutte d'eau sont mesurés à la surface des péricarpes à l'aide d'un goniomètre Digidrop de GBX (LCA/CIRIMAT, INP de Toulouse) à 20°C.

2. 7. 2. Analyse des lipides cuticulaires

a- Analyse par microscopie à balayage

Les cuticules des pommes ont été observées avant et après décirage au moyen d'un microscope électronique à balayage FEI Quanta 250 FEG (FEI Company, Eindhoven, Hollande / CMEAB, Faculté de Médecine de Toulouse) sous une tension d'accélération de 5 à 10 kV. Un échantillon de cuticule est monté sur un plot à 45° au moyen d'un adhésif double face *Tissue-Tek*. Les échantillons sont métallisés au Platine sur 10 nm.

b- Analyse par Infra-Rouge à Transformée de Fourier (IRTF)

Environ 3 mg de cires totales sont intimement broyées dans un mortier de marbre avec 250 mg de KBr anhydre. Le mélange est pressé pour obtenir une pastille uniforme et transparente qui est analysée dans un spectromètre Spectrum 65 FT-IR Spectrometer de PERKIN ELMER. Le spectre IR est enregistré en transmission entre 4000 et 400 cm⁻¹ et traité par le logiciel Spectrum.

c- Analyse par RMN du solide ¹³C

Les spectres de RMN du ¹³C à l'état solide ont été acquis au moyen d'un spectroscope BRUKER AvanceIII 400 (9,4 T). Les échantillons ont été placés dans des rotors en zircone de 4 mm. La vitesse de rotation autour de l'angle magique (MAS) a été réglée à 10 kHz. Les spectres ¹³C ont été enregistrés selon trois techniques :

- par polarisation croisée en utilisant le couplage dipolaire ¹H/¹³C (Cross Polarization Magic Angle Spinning ou CP-MAS),
- par polarisation directe pour observer l'ensemble des résonances ¹³C (Direct Polarization Magic Angle Spinning ou DP-MAS),
- et par transfert de polarisation en utilisant le couplage scalaire ¹H/¹³C (Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer Magic Angle Spinning ou INEPT-MAS).

Les spectres ¹³C ont été enregistrés avec un temps de recyclage de 2 secondes pour les expériences CP-MAS et INEPT-MAS et 10 secondes pour l'expérience DP. Pour l'expérience CP-MAS, le temps de contact a été fixé à 2 millisecondes. Pour l'expérience INEPT-MAS, les délais inter-impulsions ont été synchronisés avec la vitesse de rotation et optimisés pour un couplage scalaire J_{CH} de 140 Hz. Les temps d'acquisition moyens des expériences CP-MAS, INEPT-MAS et DP-MAS ont été de 1 ; 1,20 et 3,30 heures pour des masses d'échantillon de 60-70 mg.

d- Analyse par diffraction des RX

Environ 1 g de cires ou de cuticules sont répartis dans une coupelle. La coupelle est introduite dans le diffractomètre à rayons X MiniFlex II DesktopX-ray DIFFRACTOMETER (Rigaku). L'acquisition des diffractogrammes est réalisée par le logiciel Match ! pour des valeurs de 2Θ comprises entre 10 et 30° (Θ étant l'angle de diffraction du faisceau de rayons X).

e- Analyse par DSC

10 mg de cires ou de cuticules sont introduits dans une capsule en aluminium de 40 μL hermétiquement scellée. La cellule est introduite dans le four de l'appareil DSC-1 (METTLER TOLEDO) balayé par un courant d'azote dont le débit est fixé à 50 mL/min. L'acquisition des thermogrammes en mode TOPEM est effectuée par le logiciel STARe System. Le four est programmé comme suit : de - 40°C à 90°C à 2°C/min. La hauteur de l'impulsion est fixée à 1 K. La fréquence variable, de 15 à 30 secondes, est intégrée dans le modèle.

f- Caractérisation des extraits de cires cuticulaires par CCMHP/UV visible

Les extraits de cires sont dilués à 1 g/L dans le THF puis déposés sur une plaque de silice grâce à l'Autosampler AS3 (Camag, Suisse). Les étalons sont dilués à 1 g/L : acides oléanolique et ursolique et uvaol dans le THF, paraffines (heptacosane et nonacosane) dans le THF, alcools gras (hexacosanol, hexadecanol, docosanol, eicosanol, octadécanol, octacosanol, tétracosanol et triacontanol) dans le chloroforme, squalène, stérols (10 % campesterol et 75 % de β -sitostérol), esters (oléate d'oléyle et palmitate d'oléyle) et mélange glycéridique (monoglycérides, diglycérides et triglycérides en C18) dans l'hexane.

La plaque est éluee sur 5 cm depuis le dépôt dans une cuve en verre à fond plat saturée du mélange solvant hexane – chloroforme – méthanol (3:6:1, V/V/V). Après séchage complet, elle est scannée par le TLC Scanner III (Camag, Suisse) à 200 nm. Elle est ensuite dérivatisée par une solution d'anisaldéhyde dans l'Immersion Device III (Camag, Suisse) et de nouveau scannée à 500 et 600 nm. Le logiciel d'acquisition des données Wincats permet de tracer le densitogramme de chaque piste de dépôt.

Les plaques de CCMHP en Silica Gel 60 F254 (20 x 10 cm) sont fournies par Merck. La solution de révélation (sucres, stéroïdes, terpénoïdes) est préparée à partir d'anisaldéhyde (98 %, Aldrich) d'acide acétique (99 %, Sigma) et acide sulfurique (97 %, Sigma). Les étalons de terpénoïdes, d'alcools gras et d'alcanes ont été achetés chez Sigma Aldrich : acide oléanolique (≥ 97 %), acide ursolique (≥ 90 %), uvaol (≥ 95 %), 1-hexadecanol C16-OH (ReagentPlus 99 %, Aldrich), 1-octadécanol C18-OH (ReagentPlus 99 %, Aldrich), 1-eicosanol C20-OH (98 %, Aldrich), 1-docosanol C22-OH (98 %, Aldrich), 1-tétracosanol C24-OH (≥ 99 %, Sigma), 1-hexacosanol C26-OH (≥ 97 %, Sigma), 1-octacosanol C28-OH (≥ 99 %, Sigma), 1-triacontanol C30-OH (≥ 98 %, Sigma), heptacosane C27 et nonacosane C29 (Analytical standard ≥ 98 % Sigma-Aldrich). Le mélange de stérols est fourni par Acros Organics.

g- Quantification des composés triterpéniques des cires totales par CCMHP/UV visible

Les composés triterpéniques sont quantifiés par CCMHP-UV visible après dérivatisation à l'anisaldéhyde à 500nm. Les gammes étalons de l'acide oléanolique et de l'uvaol sont respectivement comprises entre 0-2 μg et 0-1 μg . Les extraits de cires sont dilués à 0,5 g/L dans le THF. Les courbes d'étalonnage sont obtenues en traçant l'aire des pics d'acide oléanolique et d'uvaol relevées sur les densitogrammes en fonction de la quantité d'étalon déposée.

h- Identification des paraffines et des alcools gras par CPG/DIF et CPG/SM

Les hydrocarbures linéaires à longue chaîne sont analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme CPG/DIF et identifiés par spectrométrie de masse CPG/SM. Les extraits de cires à 1 g/L dans le THF sont injectés en CPG/DIF et en CPG/SM. Les étalons

sont injectés en CPG/DIF : kit d'alcane linéaires C5-C40 (24 composés) de Supelco dilué deux fois dans le dichlorométhane.

Les alcools gras primaires sont analysés par CPG/DIF après dérivatisation par le Silyl 991 (Macherey Nagel). Les étalons : hexacosanol, hexadecanol, docosanol, eicosanol, octadécanol, octacosanol, tétracosanol et triacontanol sont préparés à 1 g/L dans le chloroforme. 160 µL de solution et 40 µL de Silyl 991 sont homogénéisés dans un insert puis chauffés pendant 2-3 minutes dans une étuve à 100°C avant injection.

Le chromatographe (VARIAN 3900) est équipé d'un injecteur split/splitless 1177 et d'un détecteur à ionisation de flamme. Le volume injecté est de 1 µL à 270°C en mode splitless d'une durée de 1 minute. Le ratio de split est ensuite fixé à 1:10. Le four est programmé comme suit : température initiale à 40°C pendant une minute puis montée rapide jusqu'à 120°C à 25°C/min puis jusqu'à 300°C à 8°C/min, la température est maintenue à 300°C pendant 8 minutes. L'hélium, gaz vecteur, est régulé à débit constant à 1,8 mL/min. La température du détecteur est fixée à 300°C. La colonne est une DB-5ms de 30 m x 0,25 mm DI x 0,25 µm épaisseur film (J&W Scientific, Agilent).

Le chromatographe (Agilent 6890 Series GC System) est équipé d'un injecteur split/splitless et d'un détecteur de masse (Agilent 5973 Network Mass Selective Detector). Le volume de 1 µL est injecté manuellement, à 270°C en mode split (1:20). Le four est programmé comme suit : température initiale à 40°C pendant une minute puis montée rapide jusqu'à 180°C à 30°C/min puis jusqu'à 280°C à 8°C/min, la température est maintenue à 280°C pendant 20 minutes. L'hélium, gaz vecteur, est régulé à débit constant à 1,3 mL/min. L'énergie des ions dans la source d'ionisation électronique est fixée à 70 eV (mode positif). Les températures de la ligne de transfert, de la source et du quadripôle sont respectivement fixées à 290, 230 et 150°C. Les paramètres du mode scan sont les suivants : m/z = 35-500 ; 3,15 scan/sec ; threshold = 150 ; sampling rate = 2. La colonne est identique à celle de la CPG/DIF.

i- Quantification des paraffines des cires totales par CPG/DIF

Le dosage des hydrocarbures linéaires à longue chaîne est effectué par étalonnage externe par CPG/DIF sur le VARIAN 3900.

Les extraits de cires totales sont dilués à 5 g/L, 1 g/L et 0,5 g/L dans le THF (n = 3). Une gamme étalon d'heptacosane et de nonacosane est préparée entre 0,1 et 0,01 g/L dans le THF. Les données sont traitées par le logiciel Varian Star.

j- Quantification des sucres simples des cires totales et des extraits méthanoliques partiels par CIHP

1 g de cires totales de chaque variété (n = 2) est extrait dans 5 mL d'eau UHQ pendant 2 heures aux ultrasons (température maximale 43°C). Le surnageant est filtré sur filtre seringue Millipore 0,45 µm en PTFE. Les sucres libres potentiellement présents sont dosés par CIHP.

Les extraits secs MeOH-VAR1, MeOH-VAR2 et MeOH-VAR3 obtenus à partir des extractions séquencées (Cf. § 2. 6.) sont préparés à environ 200 g/L de l'eau additionnée de quelques millilitres de méthanol (pour favoriser la dissolution complète). Les solutions sont diluées 25 fois dans l'eau UHQ puis filtrées sur filtre seringue Millipore 0,45 µm en PTFE. Les sucres libres sont également dosés par CIHP.

k- Caractérisation des esters de cires par CPG/DIF, CPG/SM et IRTF

Avant d'être analysés, les esters d'acides gras et d'alcools gras doivent subir une étape préalable de saponification au cours de laquelle les alcools gras sont séparés dans la phase insaponifiable et les acides gras dans la phase saponifiable. Deux protocoles de saponification ont été mis en place :

- selon le protocole de Verardo *et al.* de 2003 [12], 50 mg de cires (ou d'extraits de cires) sont homogénéisés avec 1 mL de potasse à 2 mol/L dans le méthanol et incubés pendant 3 heures dans un bain-marie à 75°C. Le méthanol est ensuite concentré à 0,1 mL sous courant d'azote. 1 mL d'eau est ajouté et la solution est extraite deux fois par 2 mL d'éther. D'une part, la phase organique est lavée deux fois par 2 mL d'eau saturée en NaCl. Elle est séchée sur MgSO₄ et évaporée à sec. Le résidu peut alors être analysé en IRTF (Cf. protocole § b-). Il est enfin repris dans du cyclohexane pour être triméthylsilylé avant analyse par CPG (Cf. protocoles § h-). D'autre part, la phase aqueuse est diluée dans 1 mL d'eau acidifiée par 3 gouttes d'HCl à 37 %. Elle est extraite deux fois par 2 mL d'éther. La phase organique est ensuite lavée deux fois par 2 mL d'eau saturée en NaCl puis séchée sur MgSO₄ avant d'être évaporée à sec. Le résidu sec peut être analysé en IRTF (Cf. protocole § b-). Il est finalement repris dans du MTBE pour être méthylé par le TMSH (100 µL de solution + 50 µL de TMSH) avant analyse par CPG (Cf. méthodes § h-) ;
- selon le protocole interne, 100 mg de cires (ou d'extrait de cires) sont homogénéisés avec 2 mL de potasse à 1 mol/L dans l'éthanol et incubés pendant 20 minutes dans un bain-marie à 75°C. Le mélange est passé au vortex au départ puis 10 minutes après, au cours de l'incubation. Il est refroidi à température ambiante avant d'être dilué dans 1 mL d'eau et passé au vortex. 6 mL d'isohexane sont ensuite ajoutés et le mélange est de nouveau passé au vortex. La phase organique est prélevée pour être triméthylsilylé et analysé par CPG (Cf. protocoles § h-). La phase aqueuse est acidifiée pour être traitée selon le protocole précédent de Verardo *et al.*

l- Dosage des anthocyanes totales dans les extraits méthanoliques partiels par spectrophotométrie UV-visible

La teneur en anthocyanes totales des extraits méthanoliques partiels est évaluée par spectrophotométrie UV visible à 528 nm. Les extraits sont préparés à 5 g / 100 mL dans le méthanol et éventuellement dilués pour que l'absorbance mesurée ($n = 2$) à 528 nm soit comprise entre 0,2 et 0,8.

La teneur en anthocyanes totales est calculée selon l'équation (7) :

$$W_C = \frac{1000000/\epsilon \times \Delta A}{l \times \rho} \times F \quad (7)$$

W_C est la teneur en anthocyanes totales de l'extrait sous la forme de cyanidine-3-O-galactoside en mg/kg ;

$\epsilon = 33780$ est le coefficient d'extinction molaire en $g^{-1} \cdot 100 \text{ mL} \cdot \text{cm}^{-1}$ du cyanidine-3-O-galactoside dans le méthanol à 0,1 % HCl à 528 nm ;

ΔA est la différence d'absorbance entre la solution échantillon et le blanc solvant ;

l est la longueur du trajet optique de la cuve soit 1 cm ;

ρ est la concentration en g d'extrait pour 100 mL de solvant ;

F est le facteur de dilution.

2. 8. Etude de l'interaction de la molécule de fludioxonil dans la cuticule des pommes Fuji par RMN ^{19}F en milieu solide

2. 8. 1. Préparation des échantillons

a- Préparation des cuticules entières

Les cuticules de pommes de la variété 2 sont isolées par voie enzymatique selon la procédure développée dans le § 2. 2. Les cuticules isolées sont conservées humides à -24°C .

b- Préparation des cuticules décirées et des cires

1 g de cuticules entières est déciré dans 25 mL du mélange solvant chloroforme/méthanol (50:50, V/V) pendant 24 heures sous agitation à $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$. Le mélange est filtré sur membrane GH Polypro $0,45 \mu\text{m}$ sous vide. Le résidu correspond aux cuticules décirées. Les cires sont récupérées après évaporation à sec sous courant d'azote du mélange solvant.

c- Sorption du fludioxonil dans les cuticules entières, les cuticules décirées et les cires

Une étude préliminaire de cinétique de sorption du fludioxonil sous sa forme commerciale Geoxe dans des cuticules lysées de pommes Fuji sur 5 jours a été mise en place. La concentration étudiée a été fixée à deux fois la LMR du fludioxonil dans les pommes (= 5 mg/kg) rapportée à la masse de cuticules lysées. Une solution de Geoxe est préparée à 0,754 g/L (soit 0,377 g de fludioxonil / L) dans une solution aqueuse contenant 5 mmol/L de CaCl_2 , 50 mg/L de NaHCO_3 et 100 mg/L de NaN_3 (Li *et al.* 2009 [13], Shechter *et al.* 2006 [14]). 250 mg de cuticules lysées (préparées selon le protocole du § 2. 2.) sont introduits dans un tube Eppendorf et 1 mL de la solution de Geoxe est ajouté. Les contenus des tubes Eppendorf sont homogénéisés sur un agitateur orbital pendant 15 min, 1, 6, 24, 48 heures et 5 jours, à $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Le surnageant est récupéré par une seringue et le fludioxonil restant est extrait par SPE. 250 μL du surnageant sont dilués dans 10 mL d'eau et déposé à 1mL/min sur une cartouche Oasis HLB 3 mL, 60 mg (Waters). La cartouche est préalablement conditionnée par 3 mL d'acétate d'éthyle, 3 mL de méthanol et 3 mL d'eau UHQ puis séchée. Après la charge, elle est rincée par 3 mL d'une solution aqueuse à 5 % de méthanol. Le fludioxonil est élué par 3 mL d'acétate d'éthyle à 1 mL/min. Le taux de recouvrement a été évalué à $96,7 \pm 1,5 \%$ ($n = 3$). La variation du taux de fludioxonil sorbé par les cuticules en fonction du temps a montré qu'en 48 heures, tout le fludioxonil présent en solution a été sorbé dans les cuticules (Figure II-3).

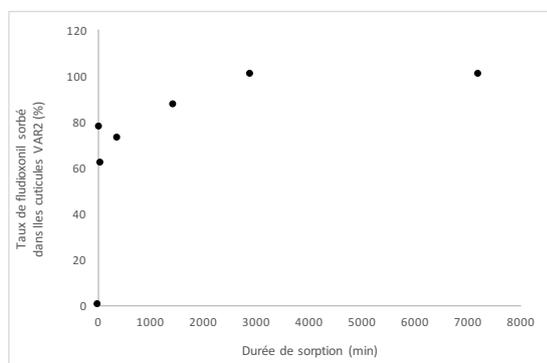


Figure II-3 : Cinétique de sorption du Geoxe (50% de fludioxonil) dans des cuticules lysées de pommes Fuji à $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$

Pour l'étude de l'interaction du fludioxonil dans les cuticules de Fuji, 5 g de matrice (cuticules lysées préparées selon le protocole du paragraphe 2. 2., cuticules lysées et décirées et cires cuticulaires

totales préparées selon le protocole du § 2. 4. 1.) sont homogénéisées dans 50 mL de Geoxe à 0,28 g/L dans l'eau déminéralisée (soit 0,14 g de fludioxonil par L) pendant 48 heures à $20 \pm 5^\circ\text{C}$. Les matrices contiennent l'équivalent de 0,14 % massique de fludioxonil. Le mélange est filtré sur papier sous vide et rincé avec un minimum d'eau déminéralisée pour éliminer le Geoxe éventuellement non sorbé. Les échantillons sont séchés à l'air libre et conservés à -24°C .

d- Désorption du fludioxonil

Environ 1 g de matrice contenant 0,14 % massique de fludioxonil est homogénéisé pendant 15 minutes dans la triacétine à $20 \pm 5^\circ\text{C}$. La solution est filtrée sur papier sous vide. Environ 500 mg sont réservés, séchés sur papier absorbant et conservés dans des tubes Eppendorf à -24°C jusqu'à analyses. Les 500 mg restants sont rincés selon la procédure suivante afin d'éliminer les résidus de triacétine : 25 mL d'eau sous vide suivi par 25 mL homogénéisés pendant 1 minute avant d'être filtrée sous vide suivi par 25 mL d'éthanol à 96 % homogénéisés pendant 1 minute avant d'être filtré sous vide suivi par 25 mL d'éthanol à 96 % sous vide. Les échantillons lavés sont séchés à l'air libre sur papier absorbant et conservés dans des tubes Eppendorf à -24°C jusqu'à analyses.

La référence correspond à l'échantillon matrice + 0,14 % de fludioxonil sorbé. Le témoin correspond à l'échantillon matrice + 0,14 % de fludioxonil sorbé ayant subi la procédure de rinçage à l'eau et à l'éthanol.

2. 8. 2. Evaluation des données dynamiques de la molécule de fludioxonil dans les différentes composantes de la cuticule par RMN du ^{19}F en milieu solide

Les spectres de RMN du ^{19}F à l'état solide ont été acquis au moyen d'un spectroscope BRUKER Avance III 400 (9,4 T). Les échantillons sont placés dans des rotors en zircone de 4 mm. Les vitesses de rotation autour de l'angle magique (MAS) ont été réglées entre 8 et 11 kHz. Les spectres ont été acquis avec la séquence d'impulsion EASY (Jaeger et Hemmann 2014 [15]) qui permet l'élimination des signaux ^{19}F extérieurs à l'échantillon (signaux parasites de la tête de mesure).

3. Résultats et discussion

Les épidermes de pommes Gala (VAR1), Fuji (VAR2) et Pink Lady® (VAR3) ont été fractionnés sur la base du schéma bilan proposé dans le chapitre I (Cf. § I- 2. 3. 2. Figure I-32). Les quatre voies de fractionnement mises en œuvre et dont les protocoles ont été décrits précédemment (Cf. § 2.), sont schématisées dans la Figure II-4 et ont permis de préparer les échantillons nécessaires aux caractérisations physico-chimiques et structurales des épidermes et plus spécifiquement des lipides qui les constituent (cires, cutine/cutane) mais également à l'étude des interactions molécule active – cuticule. Les résultats de ce chapitre sont présentés en suivant ce schéma de fractionnement.

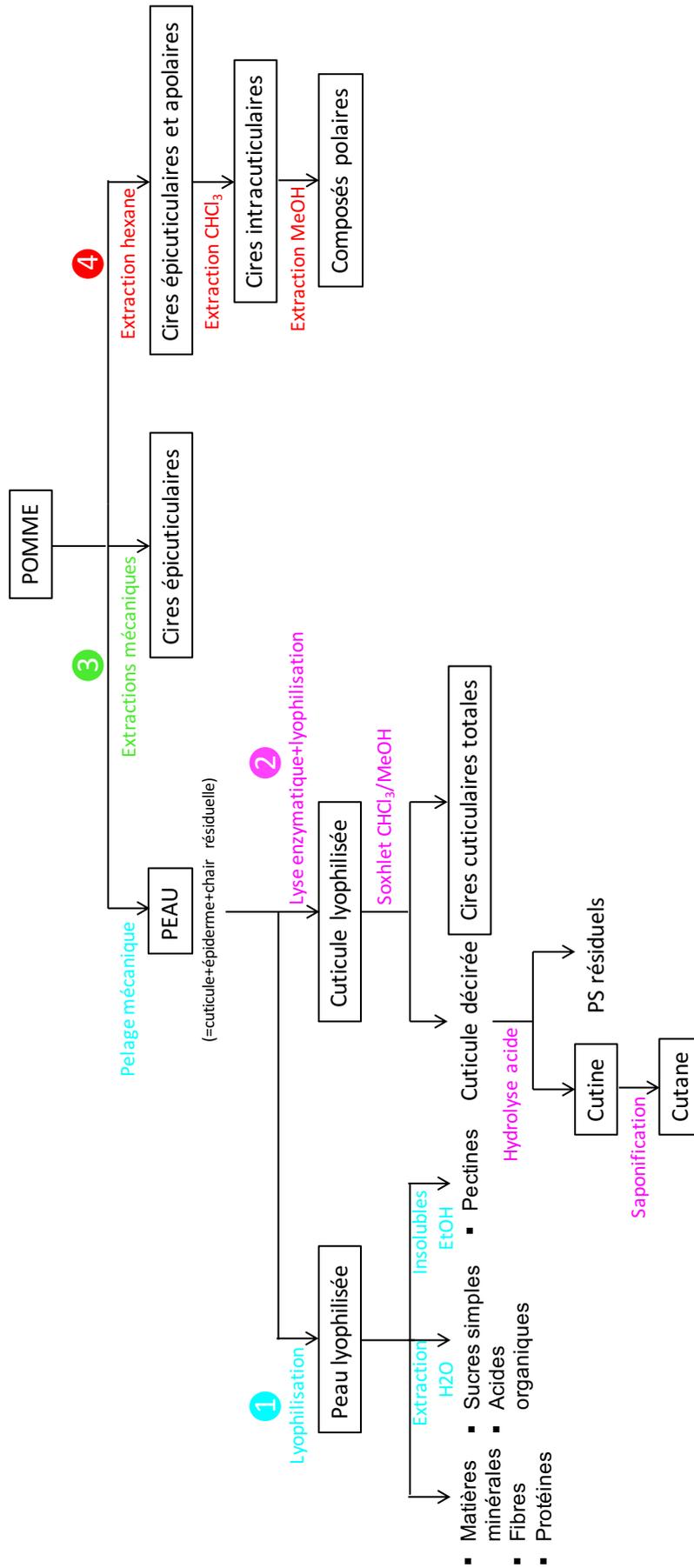


Figure II-4 : Schéma de fractionnement des épidermes de pommes pour leur caractérisation

- Dans la voie 1, les épidermes sont pelés, lyophilisés et broyés (Figure II-5) (Cf. protocole § 2. 2.). La détermination des minéraux, des fibres et des protéines est directe. Les teneurs en sucres libres, acides organiques et pectines sont obtenues après extractions aqueuse et éthanolique respectivement (Cf. protocoles § 2. 3.).

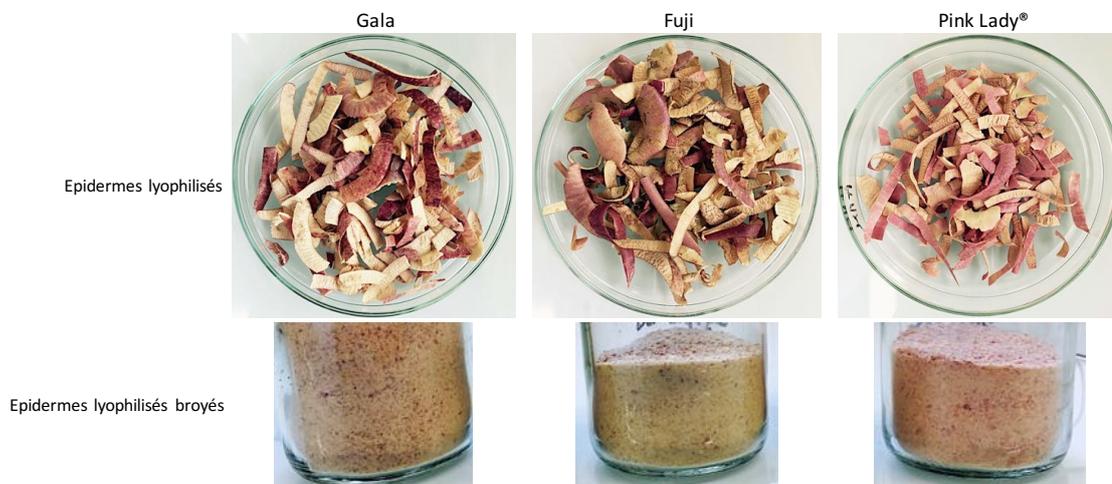


Figure II-5 : Epidermes lyophilisés puis broyés des trois variétés de pommes étudiées

- Dans la voie 2, les épidermes sont pelés, lysés par voie enzymatique, lyophilisés et broyés (Figure II-6) (Cf. protocole § 2. 2.). Le taux de cires cuticulaires est évalué par une extraction au soxhlet. La cutine et le cutane sont quantifiés à partir du résidu déciré après hydrolyse acide (élimination des monomères de polysaccharides en phase aqueuse) puis saponification (élimination des monomères de cutine en phase méthanolique) respectivement (Cf. protocoles § 2. 4.).

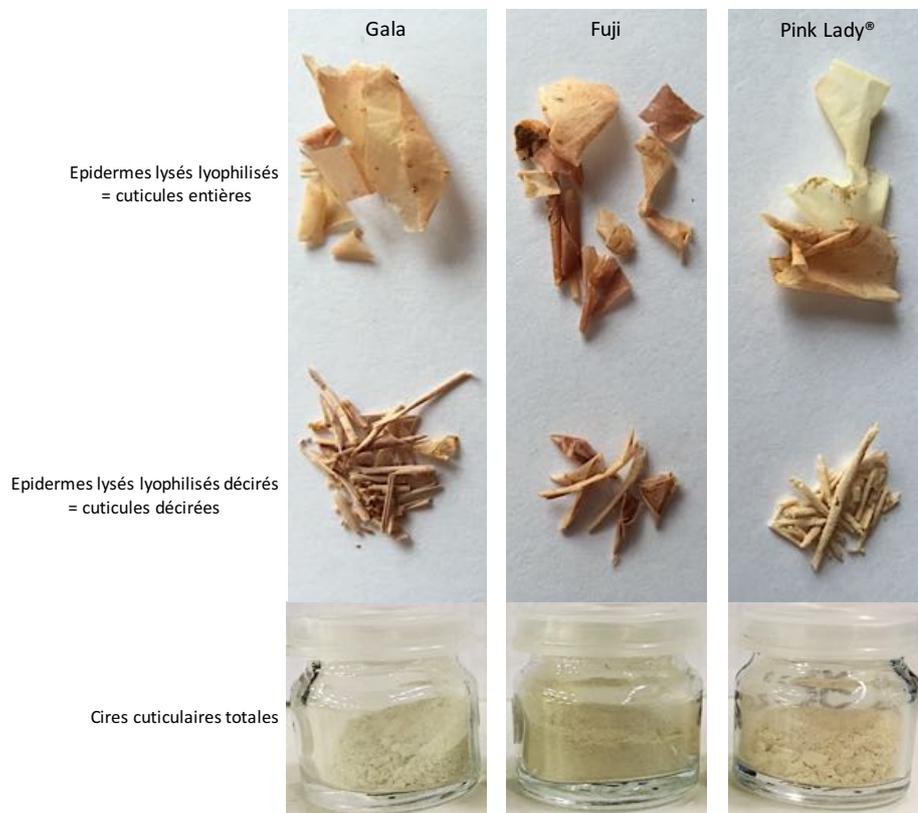


Figure II-6 : Echantillonnage des cuticules entières, cuticules décirées et cires totales des trois variétés de pommes étudiées

- Dans la voie 3, les cires épicuticulaires à la surface des pommes sont récupérées par différents moyens mécaniques (films adhésifs cryogénés, treillis métallique, cf. protocoles §2. 5.).
- Dans la voie 4, les cires sont extraites par immersions successives des fruits entiers dans des solvants de polarité croissante (hexane < chloroforme < méthanol, cf. protocoles §2. 6.).

Les deux premières voies de fractionnement ont pour objectif d'établir la composition de l'épiderme des pommes en terme de taux de matières minérales, de cellulose, hémicelluloses et lignines, de protéines, de sucres libres (fructose, glucose, saccharose et sorbitol), d'acides organiques (malique et citrique), de pectines et de lipides de la cuticule (cires, cutine/cutane) au moyen des méthodes physico-chimiques, spectroscopiques et chromatographiques de routine (gravimétrie, titrimétrie, UV/Vis, CIHP). Nous nous sommes particulièrement intéressés à la composition chimique des cires et à la caractérisation de la cutine (cuticule décirée). Nous avons mis en place une stratégie fondée sur quatre approches : (i) l'identification des groupements fonctionnels caractéristiques par IRTF et RMN du ^{13}C solide, (ii) l'analyse des cires totales extraites par Soxhlet selon la voie 2 de fractionnement par CCMHP/UV et par IRTF, (iii) l'analyse des cires épicuticulaires extraites selon la voie 3 de fractionnement et (iv) l'analyse des cires extraites par immersion des pommes entières dans des solvants selon la voie 4 de fractionnement, par CPG/DIF, CCMHP/UV, UV-visible, CIHP. En mettant en œuvre la voie 3 de fractionnement, nous avons souhaité vérifier s'il était possible de différencier les cires épicuticulaires des cires intracuticulaires tel que cela est proposé dans la littérature (Cf. § I- 2. 3. 1.). Pour cela, nous avons utilisé les acides triterpéniques (oléanolique et ursolique) comme marqueur chimique des cires intracuticulaires (Buscchaus et Jetter 2011 [9]), et suivi leur présence/absence dans les différents extraits par CCMHP et IRTF.

Sachant que l'organisation structurale moléculaire de la cuticule peut fournir des informations pertinentes sur la tortuosité du chemin de diffusion que doivent emprunter les solutés dans la cuticule (Riederer et Schreiber 1995 [16], Reynhardt et Riederer 1994 [17]), nous avons analysé les échantillons de cuticules lysées entières (avant décirage), de cuticules lysées décirées et de cires totales par diffraction des rayons X, par analyse calorimétrique différentielle à balayage (DSC), par RMN du ^{13}C solide et par microscopie électronique à balayage (MEB).

Une fois à l'intérieur de la cuticule, que deviennent les solutés et en particulier les molécules de phytosanitaires ? Pour répondre à cette problématique, nous avons évalué la mobilité de la molécule modèle, le fludioxonil, dans les différents lipides des cuticules de pommes Fuji en se basant sur les travaux de Schreiber *et al.* de 1997 [18].

3. 1. Caractérisation des épidermes des trois variétés de pommes étudiées

Les résultats des caractérisations des épidermes des pommes Gala, Fuji et Pink Lady® sont présentés dans le Tableau II-3.

Variété	Gala (VAR1)	Fuji (VAR2)	Pink Lady® (VAR3)
Epiderme (% massique de pommes)	8,0-10,4	6,6-7,7	7,6-9,9
Epaisseur moyenne (µm)	43 ± 2	25 ± 1	45 ± 3
Epiderme lyophilisé (% massique d'épiderme)	20,4	23,9	21,8
Matière sèche (%)	88,6	88,2	90,4
Cuticule (% MS épiderme)	12,4	14,0	15,8
dont lipides (% MS épiderme) :	11,8 ± 2,8	13,2 ± 0,8	14,7 ± 2,1
Cires cuticulaires totales	4,8	6,0	6,7
Cutine	6,1	6,3	7,3
Cutane	0,8	1,0	0,8
PS pariétaux résiduels	0,6	0,8	1,1
Matières minérales (% MS épiderme)	1,7	2,5	2,0
HCL (% MS épiderme)	20,2	20,1	27,5
Protéines (% MS épiderme)	2,4 ± 0,0	3,1 ± 0,0	2,6 ± 0,0
Glucides libres (% MS épiderme)	55,4 ± 4,9	44,1 ± 5,8	29,3 ± 4,3
Acides organiques (% MS épiderme)	nd	nd	nd
Pectines (% MS épiderme)	15,7	17,6	20,7
dont acide galacturonique (% pectines)	7,51 ± 0,22	7,14 ± 0,22	8,95 ± 0,36
Bilan matière	107,1	101,0	96,9

Tableau II-3 : Résultats des caractérisations chimiques des épidermes des trois variétés de pommes étudiées

Légende : MS = matière sèche

HCL = hémicelluloses, cellulose et lignines

nd = non détectés

Les épidermes des variétés 1 et 3 représentent entre 8 et 10 % en masse de fruits tandis que celles de la variété 2 représentent moins de 8 % en masse du fruit. Notons que lors de l'échantillonnage des épidermes, ceux de la Fuji ont paru plus fins sur un plan qualitatif. Ils ont été mesurés par MEB sur les épidermes lyophilisés et les mesures ont confirmé les observations : les épidermes de Fuji sont presque deux fois plus fins que ceux des pommes Gala et Pink Lady® identiques entre eux.

Les données de la littérature indiquent que les épidermes de pommes débarrassés des extractibles à l'éthanol aqueux (sucres libres et acides organiques) et des pectines après lyse enzymatique sont composés de 59 % de polysaccharides pariétaux, 30 % de lipides (cires, cutine, subérine) et 3 à 6 % de protéines pariétales (Cf § I- 1. 5. 2.) (Massiot *et al.* 1994 [19], Colin-Henrion 2008 [20]). Dans la présente étude, si les teneurs en glucides libres et en pectines sont soustraits du total des bilans matière, la composition en polysaccharides pariétaux, en lipides et en protéines des cuticules est alors égale à 58 %, 34 % et 6,7 % respectivement dans le cas de la variété 1 ; 53 %, 34 % et 7,9 % respectivement pour la variété 2 et 61 %, 31 % et 5,5 % pour la Pink Lady®. Ces valeurs sont totalement conformes aux données de la littérature.

Selon l'épaisseur de l'échantillon de peau et sa préparation, celui-ci contiendra plus ou moins d'épiderme, d'hypoderme et de chair et sera donc plus ou moins riche en polysaccharides pariétaux dont les pectines et en glucides libres. Ce paramètre a été maîtrisé dans le cadre de cette étude.

Les épidermes des trois variétés diffèrent essentiellement par leurs teneurs en glucides et en pectines (Figure II-7). La quantité de glucides libres est plus élevée dans les épidermes de Gala, de par leurs teneurs en saccharose (18,88 %) et en fructose (24,63 %) plus importantes. L'épiderme de la variété 3 contient deux fois moins de fructose (11,53 %) et de glucose (4,65 %) que celui de la pomme Gala. Il est probable que la saison de maturation des fruits, en plus de la variété, joue sur les taux de sucres. Dans le cas des pommes Gala, le développement et la maturation des fruits interviennent durant la saison chaude tandis que la Pink Lady® est récoltée au début de l'hiver. Notons que pour les trois

variétés, le ratio de 2 entre la teneur en fructose et la teneur en glucose est respecté. En revanche, l'épiderme de la variété 3 est le plus riche en pectines (20,7 %). Quant aux fibres, les teneurs en cellulose (19,3 %) et en lignine (6,6 %) sont plus importantes également dans les épidermes de la Pink Lady®. Le taux de lignines est presque deux fois plus élevé dans l'épiderme de la Pink Lady® que dans celui de la Gala. Ces résultats laissent supposer que la densité cellulaire épidermique est plus élevée pour la Pink Lady®. Les teneurs en matières minérales, protéines et hémicelluloses sont relativement faibles et proches et ne permettent pas de discriminer les différentes peaux. Aucun acide organique malique ou citrique n'a été détecté. Ils sont plutôt présents dans la chair des fruits. Selon Campeanu *et al.* en 2009 [21], onze acides organiques ont été détectés dans la chair des pommes dans une étude de 1971 et cinq de plus dans le fruit entier, provenant très probablement de l'épiderme. La teneur moyenne en acides organiques dans la littérature est de 0,6 % en poids frais (Cf. § I- 1. 5. 1.). La teneur en lipides sera plus amplement développée dans le paragraphe suivant.

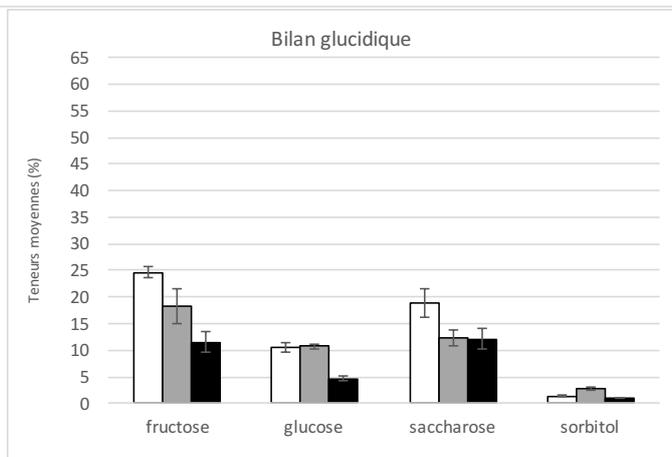
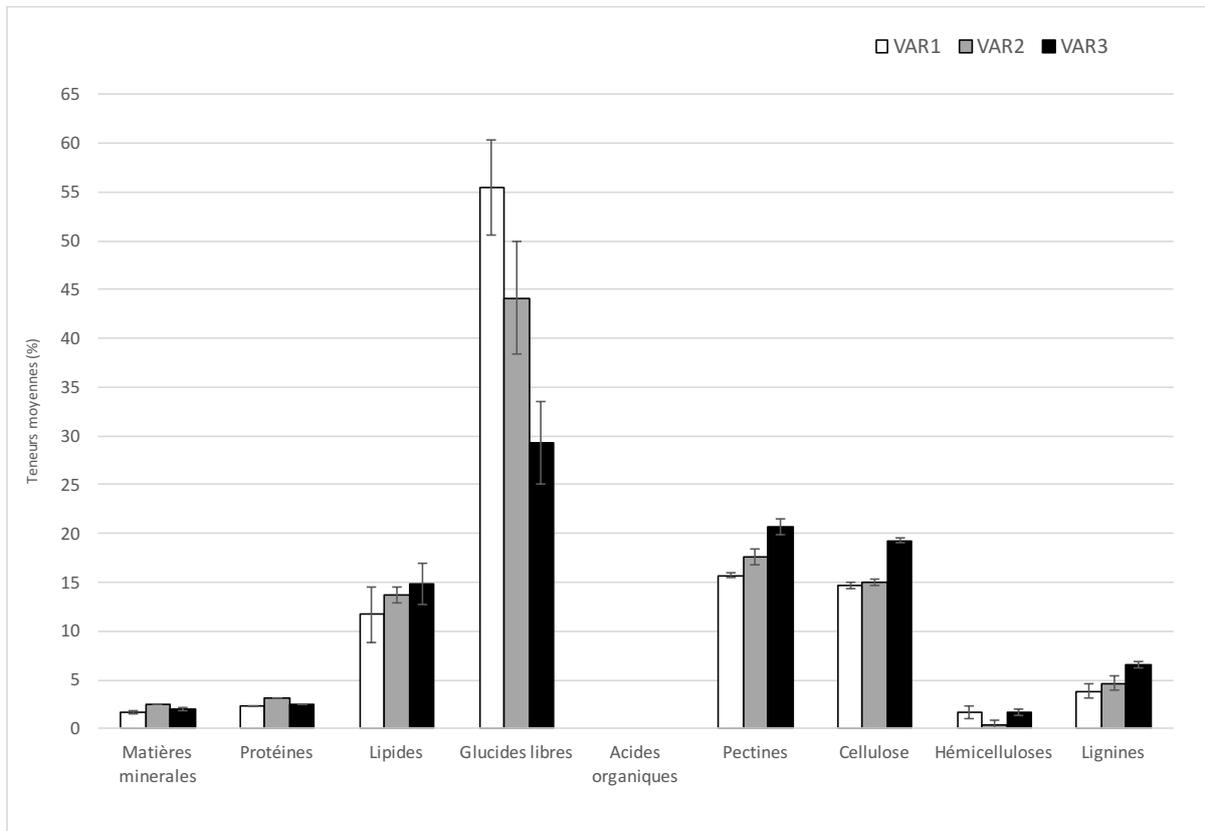


Figure II-7 : Représentation graphique du bilan matière des épidermes des trois variétés de pommes étudiées

3. 2. Caractérisation des cuticules des 3 variétés de pommes

Selon le schéma de fractionnement de la Figure II-4, la cuticule correspond à l'épiderme des fruits dans laquelle la majorité des composés liés aux cellules de l'épiderme, de l'hypoderme et de la chair a été éliminée au cours d'une digestion enzymatique (cellulase et pectinase). Elle contient donc majoritairement les lipides cuticulaires (cires, cutine et cutane) et un minimum de polysaccharides pariétaux résiduels dont la teneur est relative à l'efficacité de la lyse effectuée (nature enzymes, température et durée).

D'une manière générale, isoler la cuticule des végétaux consiste à dissoudre les pectines qui cimentent la couche cuticulaire avec la membrane épidermique externe (Bonnier 1963 [22]). Concernant les cuticules de pommes, le développement de la cutine autour de la membrane épidermique externe pénètre l'épaisseur de la membrane et descend entre les cellules de l'épiderme comme l'illustrent les micrographes des coupes de peaux de pommes de la Figure II-8. Etant donné que cette membrane est très mince, il est alors difficile de dissocier totalement la cuticule de l'épiderme des pommes. En revanche, la couche de pectines étant plus importante entre l'épiderme et l'hypoderme, elle se dissoudra beaucoup plus facilement.

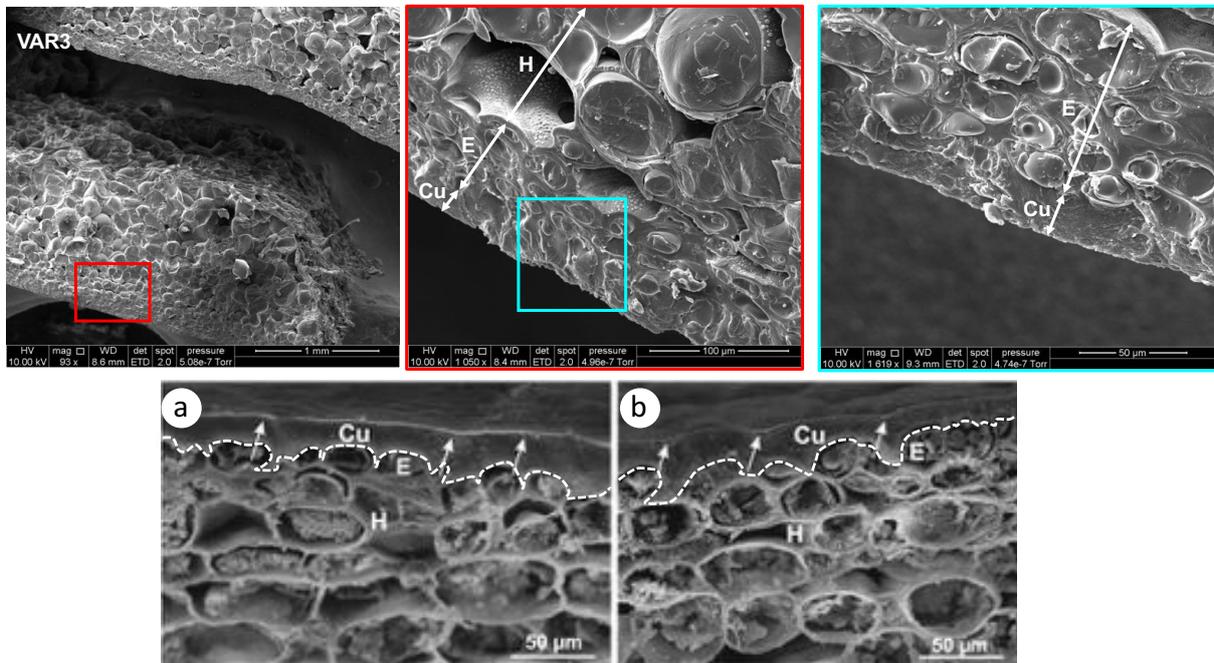


Figure II-8 : Micrographes de coupes transversales d'épidermes de Pink Lady (VAR3) observées au cryo-MEB FEI Quanta 250 FEG à 10 kV et d'épidermes de Szampion (a) et Jonagold (b) au MEB TESCAN/VEGA LMU à 30 kV d'après Konarska 2012 [7]

Légende :
Cu = cuticule
E = épiderme
H = hypoderme

Une analyse par MEB des cuticules après lyse enzymatique a permis de constater que la méthode utilisée (Cf. § 2. 2.) a éliminé les cellules de l'épiderme des pommes (Figure II-9).

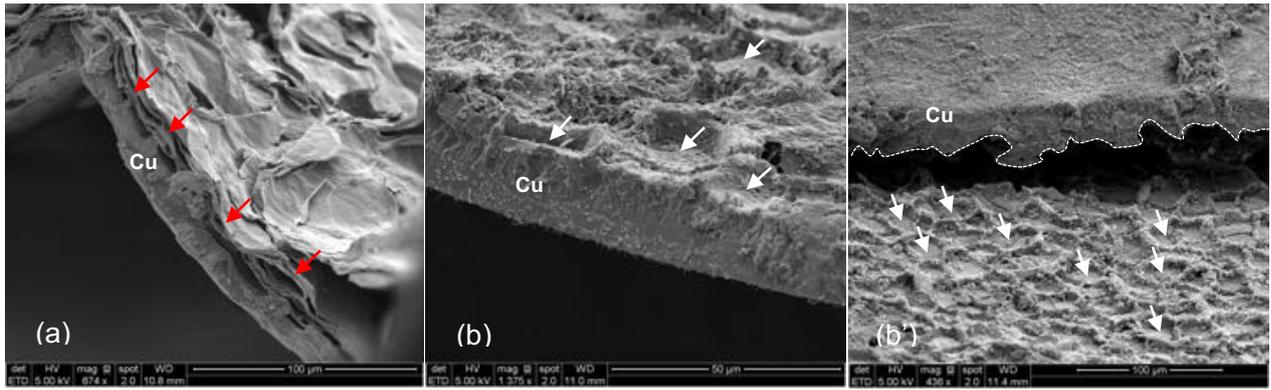


Figure II-9 :Micrographes de cuticules de Fuji (VAR2) après lyse enzymatique, observées au MEB FEI Quanta 250 FEG à 5 kV
 Légende : (a) face interne de la cuticule après lyse incomplète et décirage, (b) face interne de la cuticule après lyse complète, (b') faces externe et interne de la cuticule
 Légende : Cu = cuticule
 flèches rouges = membranes cellulaires
 flèches blanches = empreintes des cellules épidermiques
 pointillés blancs = délimitation de la surface interne de la cuticule.

La cuticule de la Figure II-9 (a) contient plus de 35 % de polysaccharides résiduels tandis que celle de la Figure II-9 (b) n'en contient qu'environ 5 % (évalués selon le protocole décrit dans le § 2. 4. 2.).

La composition chimique des lipides composant les cuticules des trois variétés de pommes a été évaluée selon les protocoles décrits dans le § 2. 4. 2. et est représentée dans les graphiques secteurs de la Figure II-10.

Variété	1	2	3
Masse pommes (kg)	49,38	47,3	38,9
HR fruit (%)	85,78	81,82	85,11
Peau (% fruit humide)	10,43	7,67	9,88
HR peau (%)	80,94 ± 1,21	79,19 ± 0,93	79,96 ± 0,43
Cuticule lyophilisée (% fruit humide)	0,25	0,23	0,31
Cires (% cuticule lyophilisée)	38,9	42,7	42,2
Cutine (% cuticule lyophilisée)	48,9 ± 0,2	45,2 ± 0,4	46,3 ± 1,2
Cutane (% cuticule lyophilisée)	6,8 ± 0,3	6,8 ± 0,6	4,8 ± 0,9
PS résiduels (% cuticule lyophilisée)	5,1 ± 0,6	5,4 ± 0,2	6,8 ± 0,5
Lipides cuticulaires (% fruit humide)	0,23	0,22	0,29

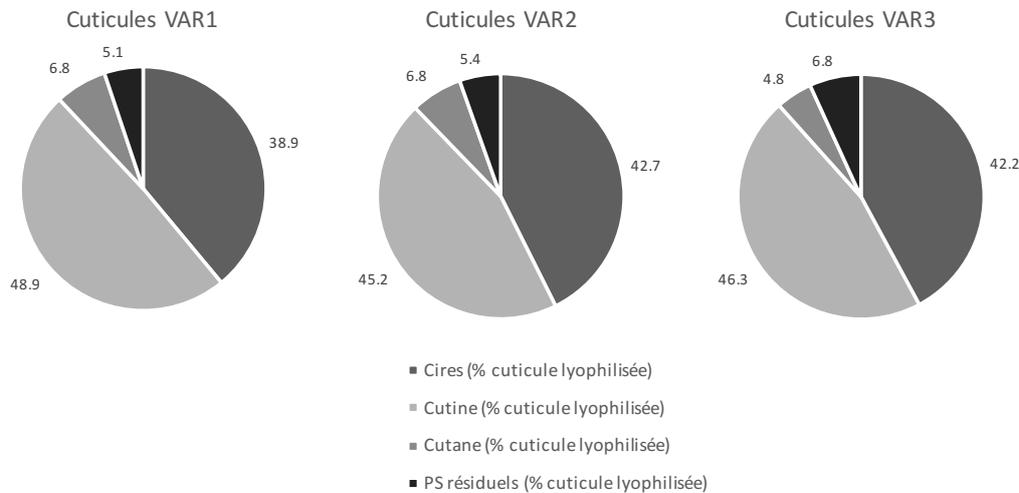


Figure II-10 : Récapitulatif des bilans matières des lipides cuticulaires des trois variétés de pommes Gala (VAR1), Fuji (VAR2) et Pink Lady (VAR3).
 Légende : PS = polysaccharides

La répartition des lipides cuticulaires est identique pour les trois variétés de pommes. Ils représentent entre 0,2 et 0,3 % en poids frais de pommes, conformément à la littérature (Cf. § I- 1. 5. 1.) (Colin-Henrion 2008 [20]). Chen *et al.* en 2008 [23] ont caractérisé les cuticules de pommes. Elles renferment 45 % de cires, 35 % de cutine, 7 % de cutane et 13 % de polysaccharides résiduels. La composition globale moyenne des cuticules dépend de leur isolation chimique. Dans la présente étude où la teneur en polysaccharides pariétaux résiduels a pu être minimisée (moins de 7 %), les teneurs en cutine sont un peu plus élevées (entre 45 et 49 %) que celles de l'étude de Chen. Les teneurs en cutane sont similaires (6,5 % en moyenne).

3. 3. Composition chimique des lipides cuticulaires

Afin de caractériser plus particulièrement les cires cuticulaires, dans un premier temps les différentes composantes de la cuticule des pommes ont été analysées par spectroscopie (IRTF et RMN). L'objectif est de mettre en évidence les différentes fonctions chimiques qui caractérisent les différents lipides de la cuticule. Dans un second temps, les cires cuticulaires ont été étudiées par différentes méthodes (CPG, IRTF, CCMHP). Dans cette partie, les principaux composés chimiques des cires ont été quantifiés. Un intérêt particulier a été porté à la possibilité d'extraire et d'identifier les deux catégories de cires : épicuticulaires et intracuticulaires. Les résultats des différentes techniques proposées dans la littérature dans ce sens (Cf. § I- 2. 3. 1.) sont présentés et discutés.

3. 3. 1. Caractérisations chimiques des lipides cuticulaires par spectroscopie

La cuticule propre est composée essentiellement de lipides, caractérisés par des solubilités différentes (Cf. § I- 2. 2.).

La cutine est un biopolymère tridimensionnel, amorphe et flexible mais présentant une certaine rigidité par réticulation. Elle est insoluble dans les solvants polaires mais est dépolymérisable par rupture des liaisons esters (Pollard *et al.* [5], Buschhaus et Jetter 2011 [9], Dugé de Bernonville 2009 [24]). Les monomères de cutine sont de nature diverse : acides gras fonctionnalisés (groupements hydroxyle, époxy) ou non, alcools gras, glycérol et composés phénoliques... La plupart du temps, ce sont des acides gras C16 à C18 ω -hydroxylés, synthétisés à partir de l'acide oléique ou linoléique. La composition en C16 et C18 de la cutine varie selon les espèces végétales. Dans le cas des pommes, le monomère majoritaire est un acide tétrahydroxystéarique (Lara *et al.* 2015 [25]). Les monomères s'assemblent par réticulation pour former des chaînes linéaires, lesquelles contiennent souvent un groupe fonctionnel oxygéné (époxy, oxo, hydroxy ou diol) en milieu de chaîne. Les hydroxyles peuvent s'estérifier avec les monomères d'acides gras ω -hydroxylés pour former un polymère ramifié localement (Cf. § I- 2. 2. 1.).

Les lipides cuticulaires solubles, *i.e.* les cires, sont caractérisés par des molécules bien identifiées dans la littérature : alcanes, esters, acides gras, alcools gras, aldéhydes, cétones, β -dicétones, composés cycliques tels que acides triterpéniques, triterpénols et polyphénols (Cf. § I- 2. 2. 3.) (Barthlott *et al.* 1998 [8]).

La caractérisation des cuticules par spectroscopies IR et Raman a permis de mettre en évidence les différents groupes fonctionnels qui caractérisent les molécules constituant les cires et la cuticule (cutine, cutane) (Chen *et al.* 2008 [23], Heredia-Guerrero *et al.* 2014 [26], Johnson *et al.* 2007 [27]). En RMN du ^{13}C solide CP-MAS, Shechter *et al.* en 2006 [14] et Johnson *et al.* en 2007 [27] identifient les

régions caractéristiques et les déplacements chimiques des carbones des groupes fonctionnels relatifs à la cuticule et aux cires cuticulaires (paraffines, alcools, amines, carbohydrates, éthers, fonctions méthoxyles, aromatiques, phénoliques, fonctions carboxyles et carbonyles et amides).

a- Identification des groupes fonctionnels par IRTF :

Dans le cadre de notre étude, l'analyse des spectres IR des différentes composantes des lipides cuticulaires a conduit à l'identification de groupements fonctionnels caractéristiques majoritaires et de composés déjà identifiés dans la littérature (Tableau II-4 et Tableau II-5).

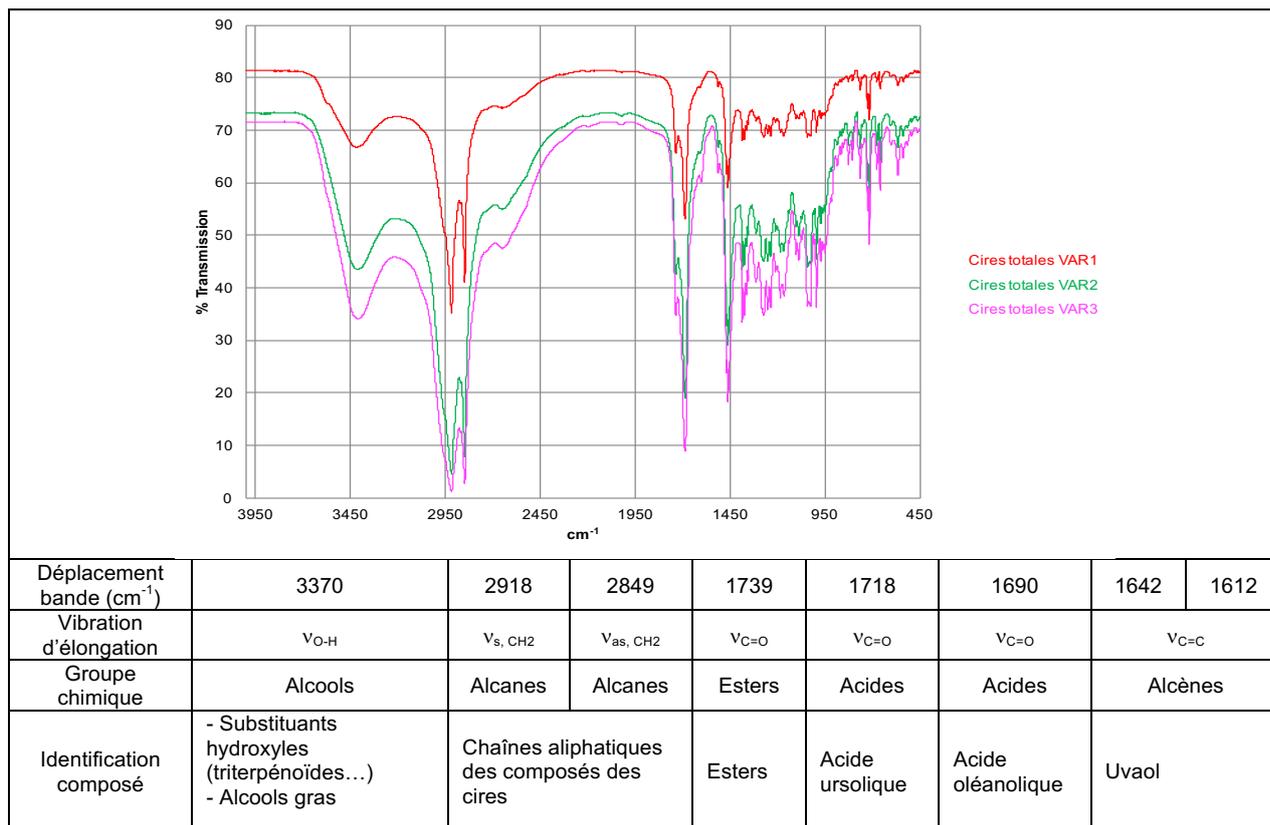


Tableau II-4 : Identification par IRTF des groupes fonctionnels majoritaires des molécules constituant les cires totales des épidermes des trois variétés de pommes Gala (VAR1), Fuji (VAR2) et Pink Lady (VAR3)

Dans les cires, quatre catégories de groupes fonctionnels majoritaires apparaissent dans les spectres IR : fonction hydroxyle OH, fonction CH₂ (chaînes grasses longues), fonction ester C=O et fonction acide C=O. Deux bandes supplémentaires C=C mais d'intensité très faible ont également été relevées. En conclusion, les esters, les hydrocarbures à longue chaîne et les composés triterpéniques (acides ursolique et oléanolique, uvaol) ont été identifiés comme les composés majoritaires (Tableau II-4).

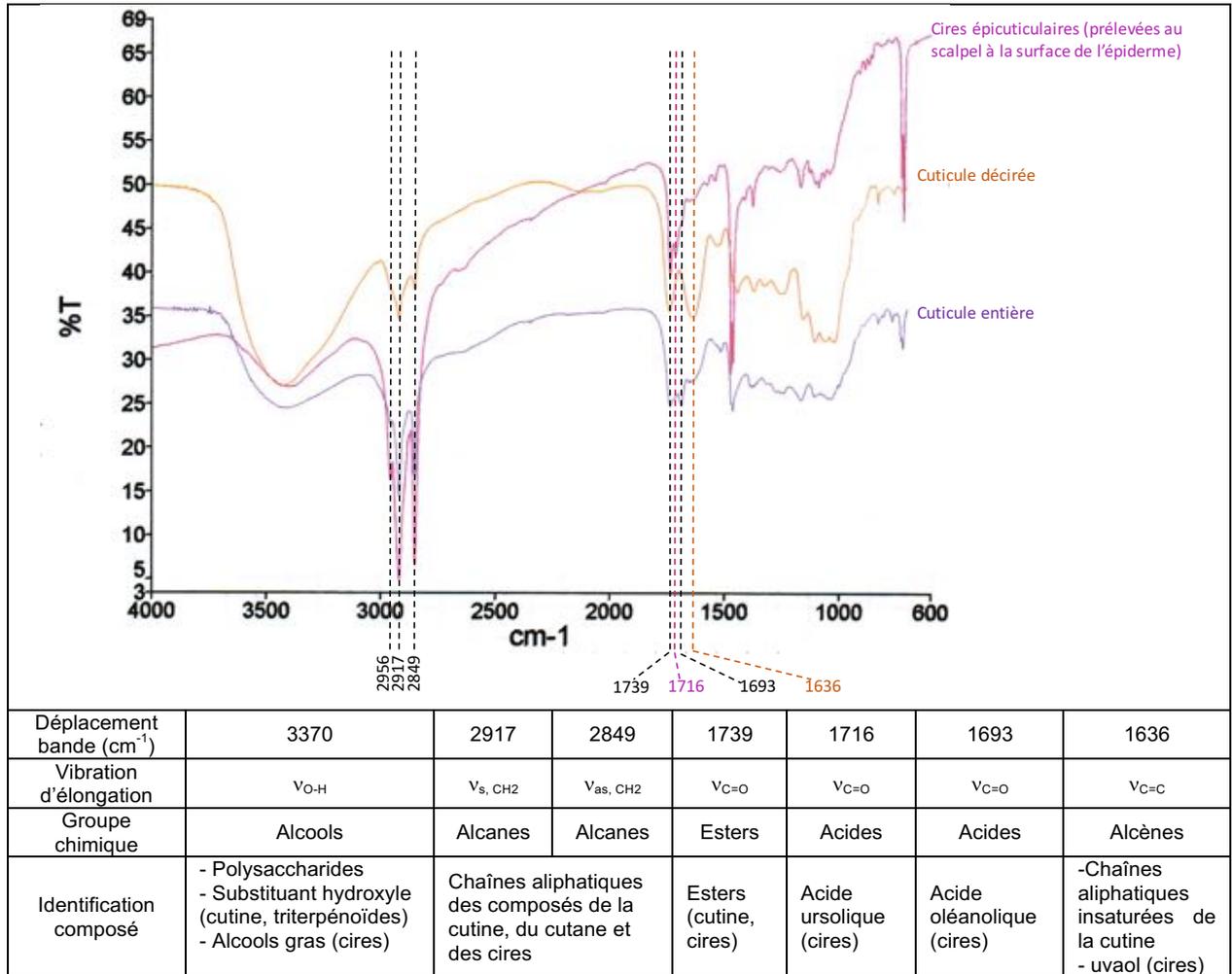


Tableau II-5 : Comparaison des profils IR des lipides cuticulaires de l'épiderme de pommes Fuji (VAR2)

En comparant les spectres IR des cires totales, de la cuticule entière et de la cuticule décirée, les attributions des groupes fonctionnels par composante sont les suivantes (Tableau II-5) :

- les fonctions OH peuvent être attribuées aux groupements hydroxyles des fonctions alcools libres des cires et des chaînes du polymère de cutine mais également aux polysaccharides pariétaux résiduels,
- les fonctions CH₂ peuvent être attribuées aux chaînes aliphatiques des cires et du polymère de cutine,
- la fonction ester C=O correspond aux liaisons esters de la cutine mais également des cires,
- la fonction acide C=O à 1716 cm⁻¹ est attribuée à l'acide ursolique des cires,
- la fonction acide C=O à 1693 cm⁻¹ est attribuée à l'acide oléanolique des cires,
- la fonction C=C est largement majoritaire dans la cuticule décirée que dans les cires ou dans la cuticule entière, elle peut être considérée comme une fonction plus spécifique de la matrice de cutine.

Notons que dans cette analyse, l'acide ursolique a été identifié dans les cires prélevées au scalpel à la surface d'une pomme Fuji. Dans la cuticule entière, la bande correspondant à l'acide oléanolique devient plus intense que celle de l'acide ursolique.

Les travaux de 2008 de Chen *et al.* [23] ont mis en évidence un déplacement hypsochrome des bandes ν_{s, CH_2} (de 2919 à 2924 cm⁻¹) et ν_{as, CH_2} (de 2850 à 2854 cm⁻¹) entre la cuticule entière et la cuticule

décirée (Cf. § I- 2. 5. 3. c-). Dans la présente étude, il n'a pas été relevé de déplacement similaire : les bandes ν_{s, CH_2} et ν_{as, CH_2} sont respectivement à 2917 et 2849 cm^{-1} dans la cuticule entière et dans la cuticule décirée.

b- Identification des groupes fonctionnels par RMN ^{13}C CP-MAS, DP-MAS et INEPT-MAS

Les cuticules, les cires totales et les cuticules décirées ont été analysées en RMN du solide ^{13}C selon trois méthodes : CP-MAS (parties rigides), INEPT-MAS (parties très mobiles) et DP-MAS (parties rigides, très mobiles et intermédiaires). Les groupes fonctionnels caractéristiques des lipides cuticulaires et des polysaccharides pariétaux ont été identifiés (Figure II-11).

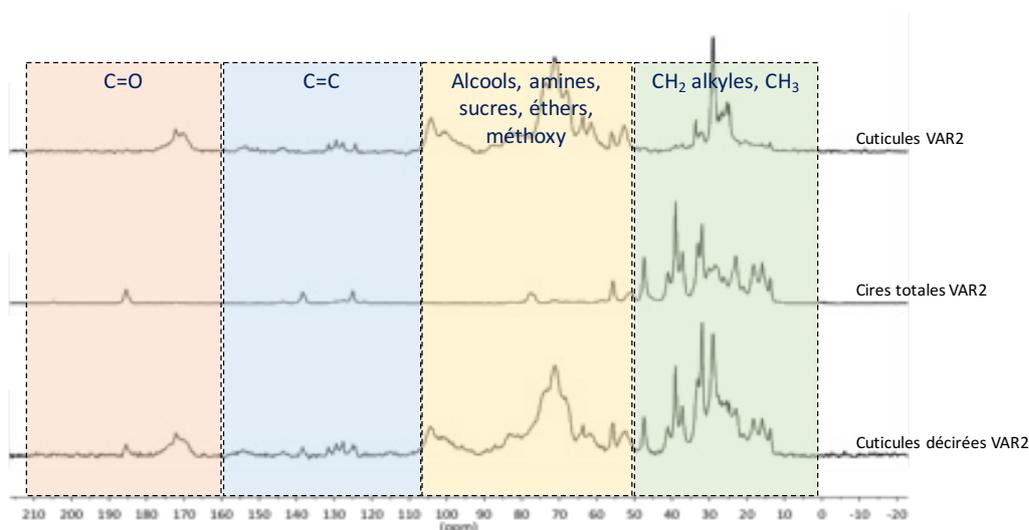


Figure II-11 : Identification par RMN CP-MAS Quant du ^{13}C solide des groupes fonctionnels majoritaires des molécules constituant les cuticules entières, les cires totales et les cuticules décirées des épidermes de pommes (Exemple de VAR2)

Les spectres des cuticules et des cires des épidermes de la Gala (VAR1) étant identiques à ceux de la Fuji (VAR2), ils ne seront pas représentés.

- Identification des polysaccharides pariétaux

Les signaux caractéristiques des polysaccharides pariétaux à 70 et 105 ppm ont été clairement relevés sur les spectres des cuticules et des cuticules décirées pour toutes les variétés (Figure II-12). Les polysaccharides, dans le cas des échantillons analysés de cuticules des pommes des variétés 1 et 2, sont particulièrement abondants car l'attaque enzymatique n'a pas abouti à une élimination totale des membranes des cellules épidermiques voire hypodermiques (voir micrographe de la cuticule décirée VAR2 dans la Figure II-12). Ces cuticules contiennent entre 32 et 35 % de polysaccharides pariétaux résiduels (évalués selon le protocole décrit dans le § 2. 2.) alors que la cuticule de la variété 3 n'en contient que 5 %. En effet, les signaux relatifs aux atomes de carbone correspondants sont très faibles dans les spectres des cuticules VAR3 (Figure II-12). L'analyse par MEB de la cuticule décirée VAR3 n'a mis en évidence aucune paroi cellulaire résiduelle visible, sauf leur empreinte sur la face interne des cuticules (voir micrographe de la cuticule décirée VAR3 dans la Figure II-12).

Dans les spectres des cires cuticulaires, aucun signal relatif aux atomes de carbone de polysaccharides n'a été détecté.

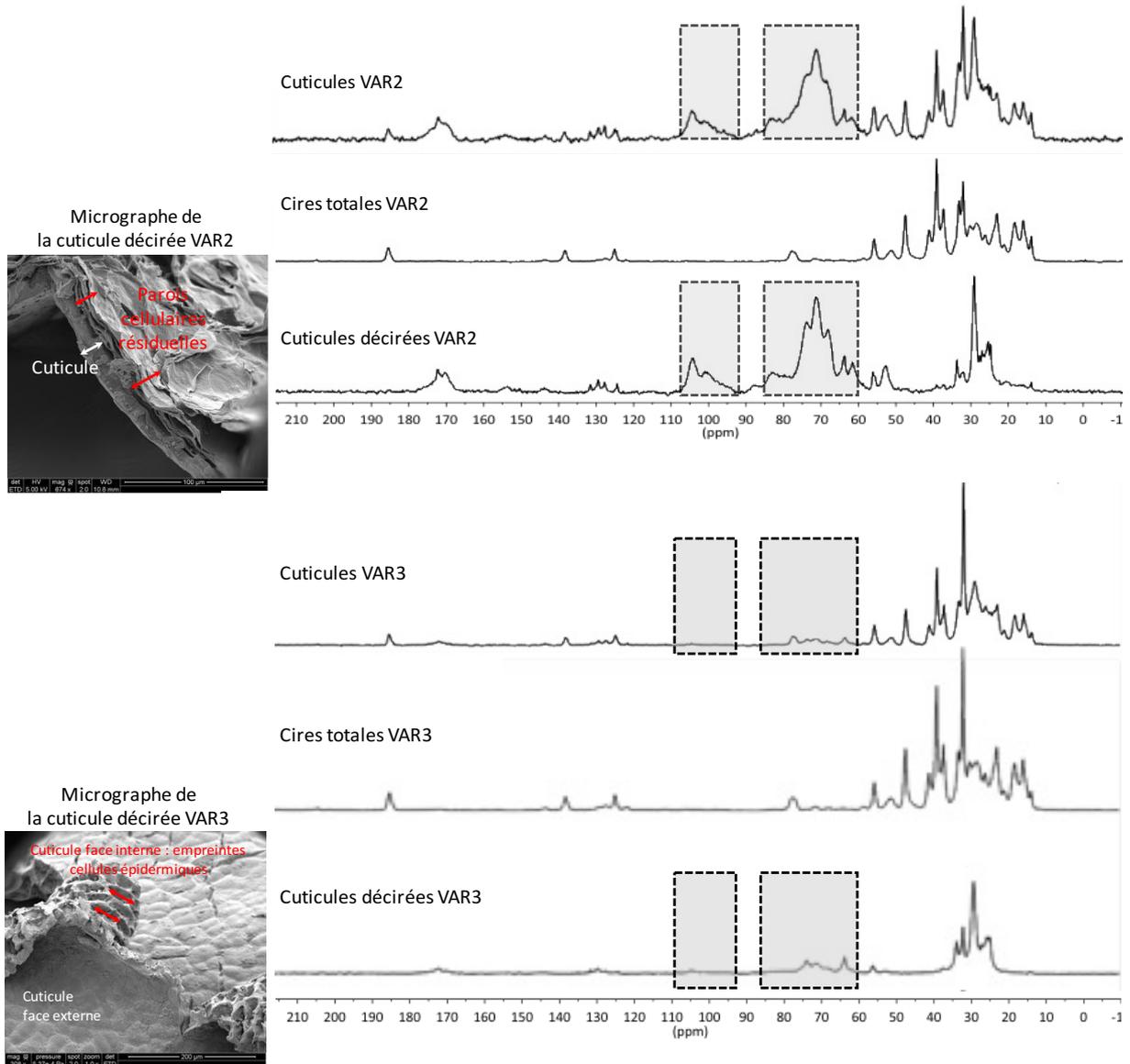


Figure II-12 : Identification par RMN CP-MAS des polysaccharides pariétaux dans les différentes composantes des épidermes des pommes Fuji (VAR2) et Pink Lady (VAR3)

- Identification des acides triterpéniques

Les acides triterpéniques ont été identifiés dans les spectre des cires grâce au signal caractéristique du carbone acide C28 à 185 ppm (Figure II-13). Le déplacement du carbone C=O acide est plus déblindé que celui du carbone C=O ester. Les carbones éthyléniques C12 et C13 sont également bien visibles vers 125 et 140 ppm. Enfin, le C3 portant la fonction alcool à 78 ppm, distinct sur le spectre des cires, peut être masqué par le signal parfois imposant des polysaccharides sur le spectre des cuticules entières (VAR1 et VAR2). Il est facilement distingué dans le spectre des cuticules entières de VAR3 (surligné en rose dans la Figure II-13).

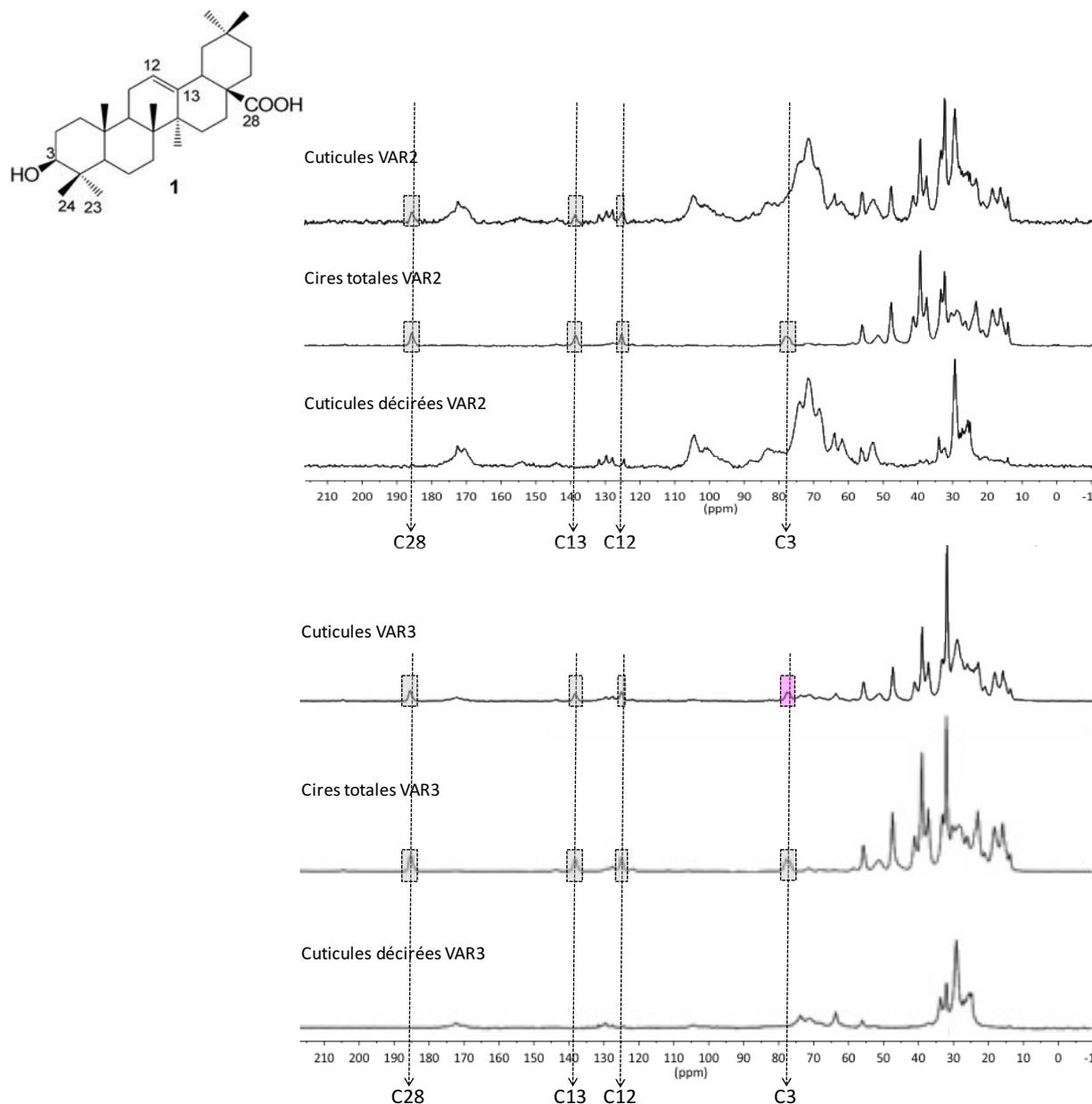


Figure II-13 : Identification par RMN CP-MAS des acides triterpéniques dans les différentes composantes des épidermes des pommes Fuji (VAR2) et Pink Lady (VAR3) et (1) formule développée de l'acide oléanolique

Par différence entre les spectres CP-MAS des cires et des cuticules, les fonctions C=O esters de la cutine ont pu être mises en évidence à 170 ppm (Figure II-14). De même, dans la zone des carbones éthyléniques vers 130 ppm, plusieurs signaux qui ont été attribués au groupement C=C des chaînes grasses en C18:1 qui composent une partie des chaînes du polymère de cutine sont présents uniquement dans les cuticules décirées (Colin-Henrion 2008 [20]).

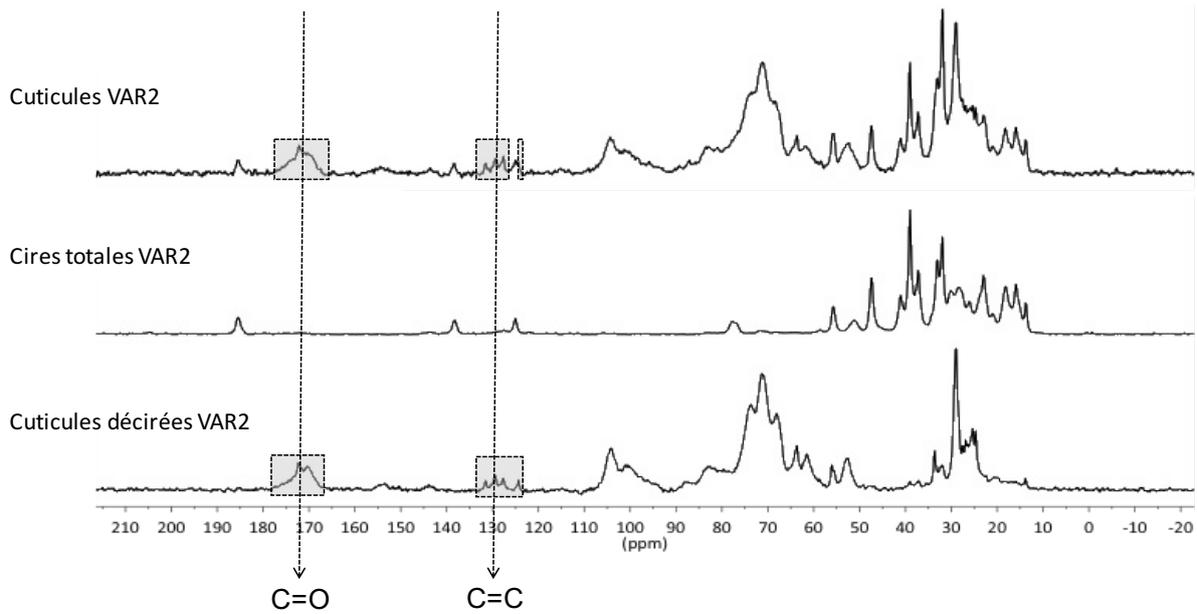


Figure II-14 : Identification par RMN CP-MAS des chaînes carbonées dans les différentes composantes des épidermes des pommes Fuji (VAR2)

Notons qu'aucune fonction ester n'a été détectée sur le spectre CP-MAS des cires bien que les esters fassent partie des composés fréquemment identifiés dans les cires cuticulaires. De plus, une bande ester a bien été identifiée dans les extraits de cires analysés par IRTF. En comparant les spectres de RMN CP-MAS et DP-MAS, des fonctions esters apparaissent, de même que des carbones éthyléniques (Figure II-15).

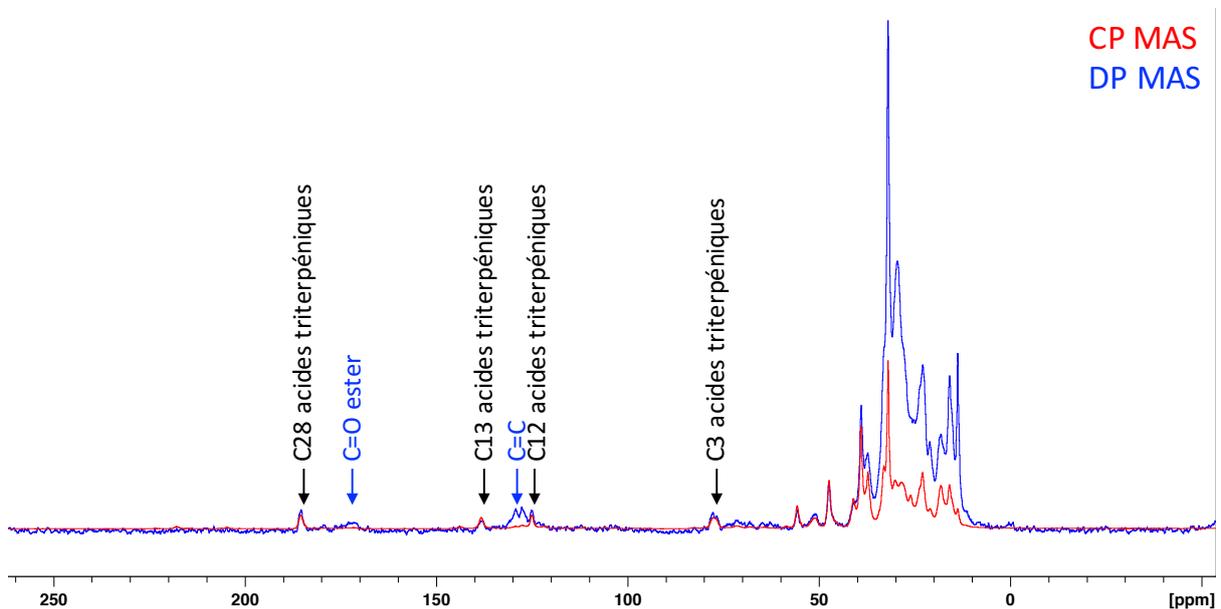


Figure II-15 : Identification par RMN DP-MAS des esters et des carbones éthyléniques dans les cires cuticulaires (VAR2)

Nous reviendrons dans le paragraphe 3. 4. sur la structure des lipides, mais en conclusion de ces deux analyses, les esters et les composés éthyléniques seront localisés dans des zones de mobilité intermédiaire tandis que les acides triterpéniques font partie des zones rigides des cires. Aucune structure très mobile n'a été détectée dans les spectres INEPT-MAS des cires.

- Identification des chaînes alkyles

La zone initiale des spectres entre 0 et 50 ppm correspond aux signaux des carbones des CH₂ et CH₃ terminaux des chaînes aliphatiques et des structures cycliques insaturées. La Figure II-16 (A) met en évidence les signaux caractéristiques qui peuvent être attribués aux groupes alkyles des cires uniquement tandis que la sélection surlignée en gris de la Figure II-16 (B) met en évidence ceux communs aux cires et à la cutine.

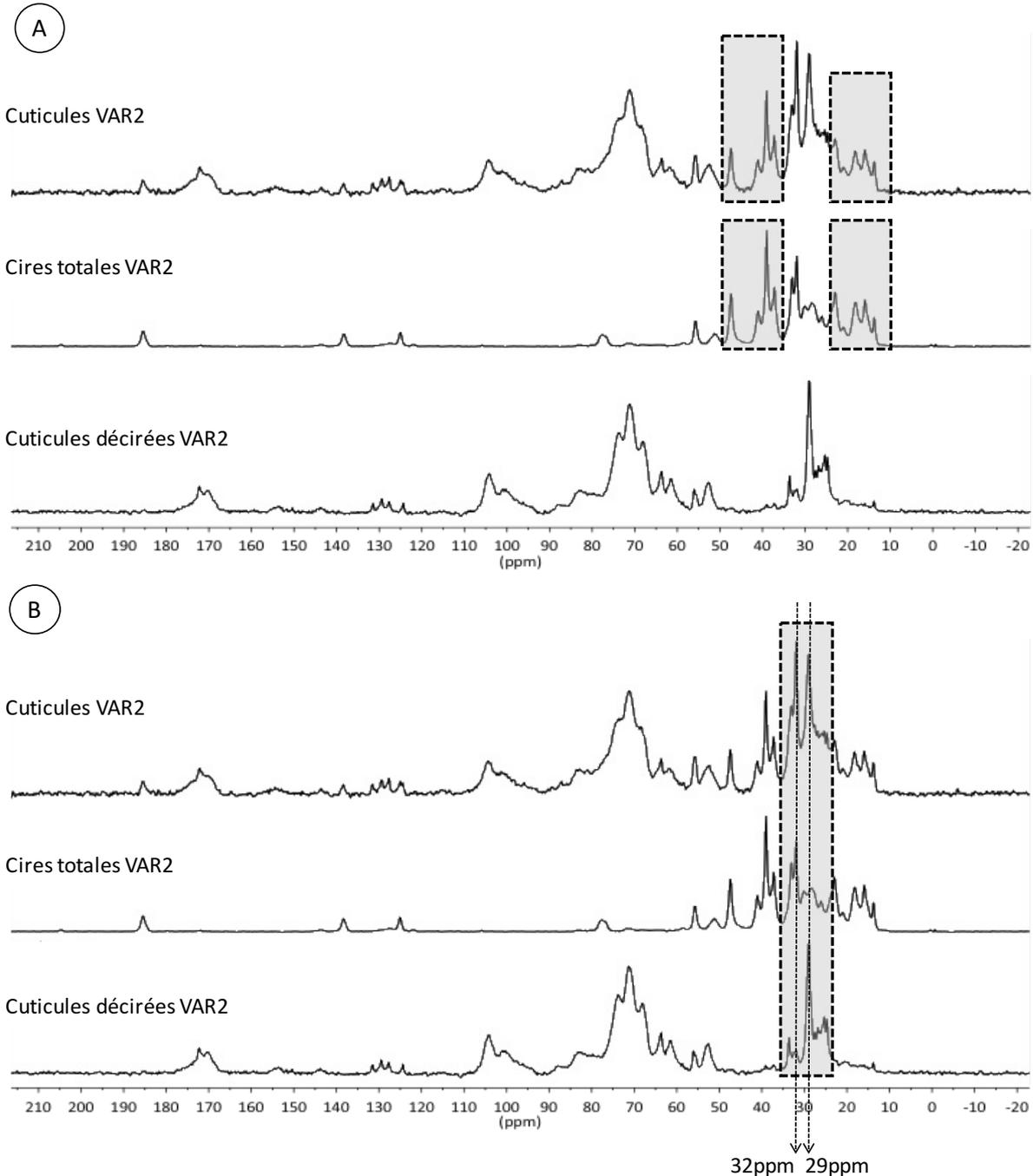


Figure II-16 : Identification par RMN CP-MAS des chaînes hydrocarbonées des cires et des cuticules de pommes, (A) mise en évidence des composants spécifiques des cires, (B) mise en évidence des composés des cires et de la cutine (VAR2)

Dans la littérature, le ratio 29/32 mesuré dans les spectres de RMN CP-MAS est souvent utilisé comme un indicateur des structures amorphes et mobiles (Cf. § I- 2. 5. 3. d-). Plus rigoureusement, les signaux

à 29 et 32 ppm donnent une indication sur la conformation des chaînes alkyles, gauche et anti d'une part, entièrement trans d'autre part. Le ratio 29/32 sera abordé plus en détail dans la partie 3.4.

En conclusion de cette approche globale de caractérisation des lipides de l'épiderme des pommes par des méthodes spectroscopiques, conformément à la bibliographie, la cuticule est constituée :

- de cires à 40 % dont les composés majoritaires sont les acides triterpéniques, des hydrocarbures et des esters à longues chaînes hydrocarbonées, les fonctions hydroxyles peuvent être attribuées aux acides triterpéniques (fonction OH en C3, cf. formule développée dans la Figure II-13) et à l'uvaol mais également à des alcools gras primaires et secondaires à longues chaînes ;
- de cutine à 45 % essentiellement constituée par des esters à longues chaînes hydrocarbonées avec des fonctions hydroxyles et des carbones éthyléniques ;
- d'une plus ou moins grande quantité de polysaccharides, variant de 5 à 35 % selon la méthode de préparation des épidermes avant analyses.

Il est possible de quantifier par RMN CP-MAS et DP-MAS les différentes molécules présentes dans les lipides cuticulaires à condition que les temps de relaxation soient suffisamment longs. Toutefois, la RMN ne donne pas un pourcentage massique mais un pourcentage en nombre d'atomes. Pour cela, il faut identifier des signaux spécifiques de chaque composé ainsi que le nombre de carbones correspondant. Les valeurs ainsi quantifiées sont relatives. Les échantillons analysés dans cette étude sont très complexes. Les signaux de nombreuses molécules peuvent se superposer, comme par exemple dans la zone 0-50 ppm, dans laquelle les signaux des hydrocarbures aliphatiques des cires se confondent avec les CH₂ des chaînes grasses d'autres composés tels que des alcools gras, des esters des cires et de la cutine... Les signaux correspondant à la fonction acide C=O des deux acides triterpéniques identifiés par IRTF ne sont pas non plus discriminés. Pour ces raisons, les différents composés majoritaires des cires sont quantifiés par des méthodes plus conventionnelles ci-après.

3. 3. 2. *Caractérisations chimiques des cires cuticulaires*

Dans un premier temps, les différents composés des cires totales, obtenues par une extraction au soxhlet des épidermes lysés (Cf. protocoles § 2. 2. et 2. 4. 1.) ont été identifiés par CCMHP/UV-Visible.

Dans un second temps, les composés majoritaires ont été quantifiés : les triterpénoïdes par CCMHP/UV-Visible et les alcanes par CPG/DIF. La présence des sucres libres et acides organiques, bien que peu probable dans des échantillons ayant subi une lyse enzymatique, a également été recherchée par CIHP. La relation entre l'hydrophobicité de surface (mesurée par l'angle de goutte) et la composition chimique est discutée.

Les résultats des extractions sélectives des cires épicuticulaires par actions mécanique et adhésive (Cf. protocoles § 2. 5.) et par immersions séquentielles dans différents solvants successifs (Cf. protocoles § 2. 6.) sont présentés et discutés. Les composés chimiques majoritaires ont également été quantifiés : les alcanes et les triterpénoïdes dans les extraits à l'hexane et au chloroforme par CPG/DIF et CCMHP/UV-Visible respectivement, les sucres et les acides organiques dans les extraits méthanoliques par CIHP. La probabilité d'une discrimination des cires épicuticulaires des cires intracuticulaires est discutée.

3. 3. 2. 1. Caractérisation chimique des cires issues des lysats enzymatiques des épidermes

a- Les rendements en cires

Les cires cuticulaires totales des trois variétés de pommes ont été extraites à partir des cuticules (épidermes lysés) par Soxhlet dans un mélange chloroforme/méthanol (Cf. protocoles § 2. 2. et 2. 4. 1.). Les rendements ont été calculés par rapport aux épidermes frais et aux fruits frais (Tableau II-6)

Variété	1	2	3
Masse pommes (kg)	49,38	47,3	38,9
Masse épidermes (kg)	5,150	3,630	3,845
Nb pommes	354	324	244
Calibre (Diam en mm)	65-70	70-75	70-75
Calibre moyen (mm)	67,5	72,5	72,5
Aire d'une pomme (cm ²)	143,14	165,13	165,13
Aire totale (cm ²)	50671,56	53502,12	40291,72
Masse cires (g)	47,2	46,56	51,46
Rendement cires (mg/cm²)	0,931	0,870	1,277
Rendement cires (g/kg poids frais d'épidermes)	9,165	12,826	13,384
Rendement cires (mg/kg poids frais de pommes)	955,9	984,4	1322,9

Tableau II-6 : Rendements d'extraction des cires totales des cuticules (Variétés 1, 2 et 3)

Environ 50 g de cires ont été extraits des épidermes des trois variétés de pommes, soit en moyenne 40 % en masse des cuticules (Cf. § 3. 2. Figure II-10). Ces teneurs sont conformes à la littérature (Chen *et al.* 2008 [23], Johnson *et al.* 2007 [27]). Les trois variétés de pommes ne semblent pas être discriminées. Pourtant, la biosynthèse des cires est influencée par de nombreux facteurs biotiques, dont l'espèce et la variété végétales, et abiotiques, dont les facteurs topographiques, climatiques, nutritifs, chimiques, de stockage après récolte... (Cf. § I- 2. 4.) (Shepherd et Griffiths 2006 [28], Curry 2003 [29] et 2008 [30], Szakiel *et al.* 2012 [31]). De façon importante, certains de ces facteurs peuvent aussi bien favoriser le développement de la cuticule que l'inhiber (Curry 2003 [29] et 2001 [32]). En pondérant la quantité de cires extraites par la masse d'épidermes frais ou la masse de fruits frais et par la surface totale des épidermes, les pommes Pink Lady® (VAR3) ont produit jusqu'à 1,5 fois plus de cires que celles des deux autres variétés. Il faut noter que ces résultats correspondent à une seule saison et ne doivent pas être généralisés sans une étude des variabilités inter saisons. Dans cette étude, quel(s) facteur(s) peu(ven)t être à l'origine de cette production plus importante de cires ? Les trois variétés étant toutes issues de la même région du Sud-Ouest de la France, bénéficiant d'un climat plutôt doux, même en hiver, les facteurs topographiques, climatiques et liés aux nutriments ont été considérés comme constants et négligeables. Il faut noter que la partie stockage des pommes après récolte n'a pas pu être maîtrisée jusqu'à la livraison des échantillons au laboratoire, où ils ont été traités dès réception (pelage et lyses enzymatiques). Mais il a été supposé que les conditions de stockage ont été identiques pour les trois variétés. Si les facteurs chimiques peuvent être responsables d'une partie de la biosynthèse des cires, il est important de relever que les variétés 2 et surtout 3 sont plus traitées que la variété 1.

Les calibres des pommes étudiées ici sont identiques et relativement modestes. En général, plus le calibre est élevé, plus la tendance aux craquelures est marquée. Malgré cela, il n'est pas exclu que l'épiderme de la PinkLady® ait subi des contraintes plus ou moins fortes au cours de son développement voire de son stockage sur cette récolte, liées à des phases de croissance rapides et/ou

des stress hydriques qui ont conduit à un nombre de craquelures plus élevé (Cf. § I- 2. 2. 5.). La quantité de cires y est toujours très dense (Konarska 2012 [7], Curry 2001 [32], Roy *et al.* 1999 [33]).

b- Identification des composés majoritaires des cires totales par CCMHP/UV-visible

Les extraits de cires et les étalons correspondant aux composés chimiques des cires cuticulaires ont été analysés par CCMHP/UV-visible (Cf. protocole § 2. 7. 2. f-). Les résultats sont présentés dans la Figure II-17. En comparant les profils chromatographiques des cires avec ceux des étalons dont la présence a pu être établie par les données de la littérature et sur la base de l'identification par spectroscopie des groupements fonctionnels (Cf. 3. 3. 1.), les composés suivants ont pu être identifiés dans les cires cuticulaires des trois variétés de pommes :

- des composés triterpéniques entre $R_f = 0,5$ et $R_f = 0,6$ (acides oléanolique, ursolique et uvaol),
- des paraffines à $R_f = 0,99$ (détectables après dérivatisation à la primuline),
- des esters en front de solvant à $R_f = 1,0$.

La détection des alcools gras primaires par CCMHP, même après dérivatisation chimique de la plaque de silice, est très faible. Cette technique est inadaptée dans ce cas. La présence d'alcools gras primaires libres devra être vérifiée par CPG/DIF.

Revenons sur l'identification des esters à $R_f = 1,0$. Les profils CCMHP de la Figure II-17 montrent que trois composés sont coélus dans le système étudié (Cf. protocole § 2. 7. 2. f-) : le mélange d'esters (oléate et palmitate d'oléoyle) représentant les esters d'acides gras et d'alcools gras des cires cuticulaires, le squalène (terpénoïde), les diglycerides et triglycérides (esters d'alcools gras et de glycérol) et les paraffines. La présence de mono, di et triglycérides est peu probable : ce sont les lipides typiques des graines oléagineuses. Ils n'ont pas été identifiés dans les lipides cuticulaires. La présence de squalène est généralement associée avec les stérols en tant que métabolite apparaissant dans la biosynthèse du cholestérol. Les stérols dont le β -sitostérol ont été identifiés dans les cires cuticulaires (Verardo *et al.* 2003 [12], Szakiel *et al.* 2012 [31]). Dans les extraits de cires des trois variétés de pommes, un signal a été relevé à $R_f = 0,7$ correspondant au R_f des stérols. Il est donc possible que des stérols soient présents dans les cires étudiées. La possibilité de la présence du squalène en front de solvant ne peut donc pas être pour le moment exclu. Etant donné que la présence des esters d'acides gras et d'alcools gras des cires est par essence inévitable, il est donc conclu à un co-développement des esters, des paraffines et du squalène. Une analyse supplémentaire par CPG/DIF et CPG/SM pourra confirmer ou infirmer la présence du squalène. Même si celle-ci est avérée dans les cires cuticulaires (Bouzoubâa *et al.* 2011 [34]), elle n'a pas été relevée dans les cires de pommes dans la littérature.

Une dernière zone de composés au dépôt ($R_f = 0,0-0,5$) est également visible sur les profils CCMHP des cires cuticulaires des trois variétés (Figure II-17). Cette zone correspond au retardement des étalons de sucres (fructose, glucose et saccharose) et de phloridzine, un polyphénol identifié dans les pommes (Veberic *et al.* 2005 [35]). Même s'il est peu probable que des sucres libres aient pu être encore présents dans les échantillons d'épidermes après les lyses enzymatiques, la teneur en sucres libres et en acides organiques sera vérifiée par CIHP.

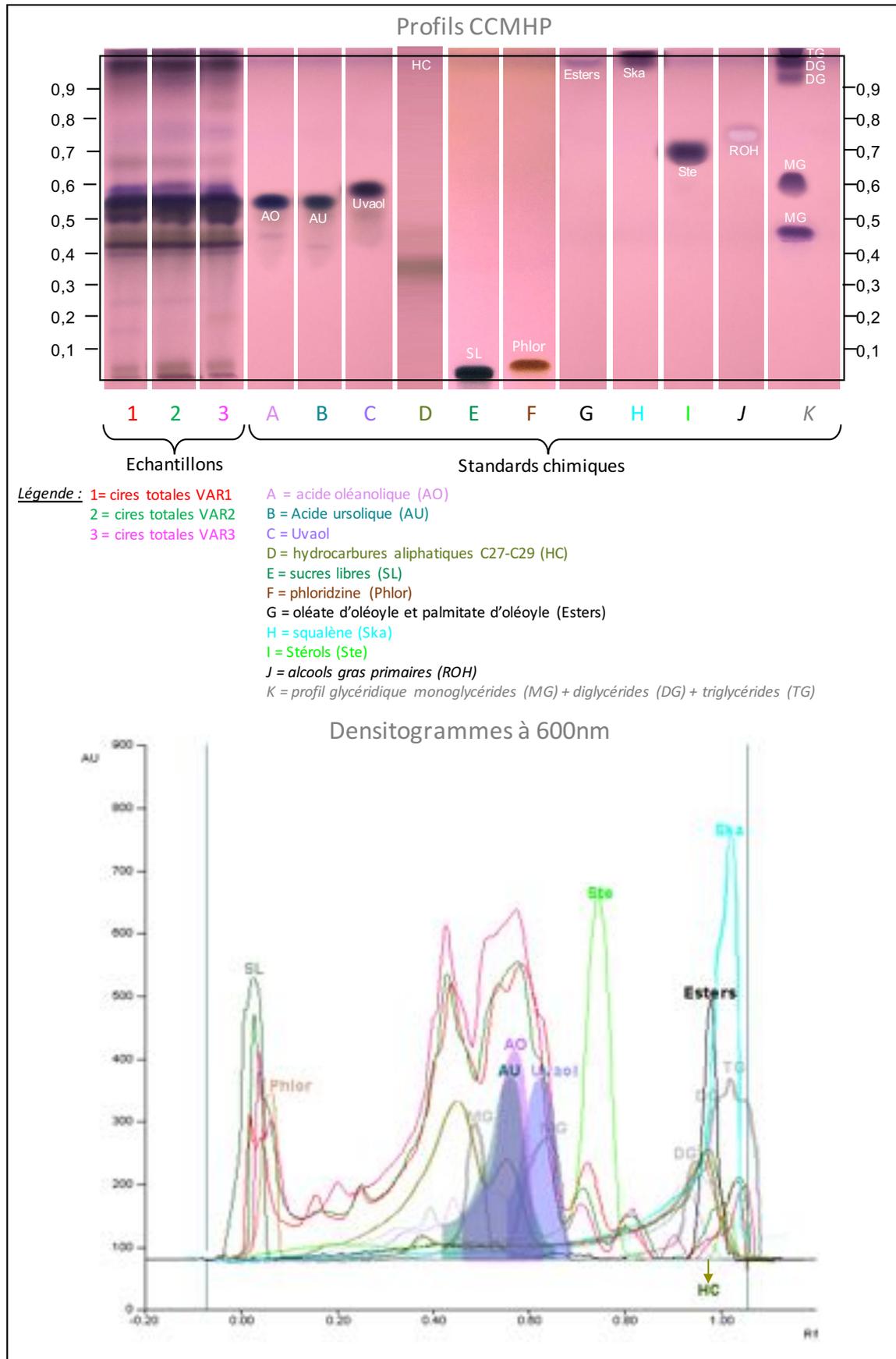


Figure II-17 : Profils CCMHP et densitogrammes à 500 nm après dérivatisation à la vanilline sulfurique des cires cuticulaires totales des épidermes de pommes et des étalons chimiques (Variétés 1, 2 et 3)

c- Quantification des composés triterpéniques par CCMHP/UV-visible

Les acides oléanolique et ursolique sont des isomères de position (Figure II-18).

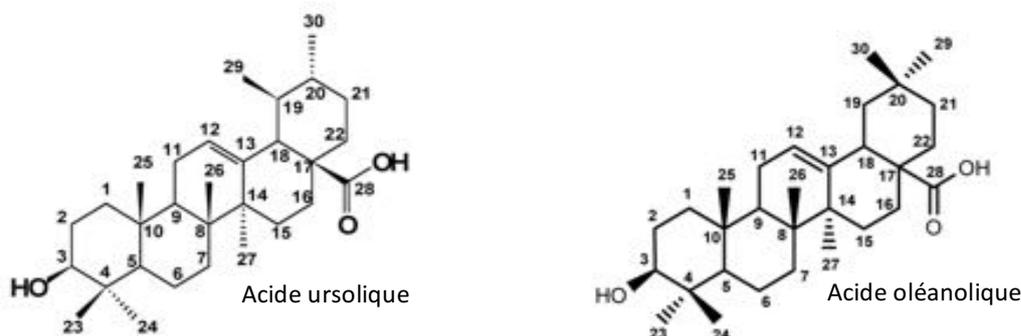


Figure II-18 : Formules développées des acides triterpéniques identifiés dans les cires cuticulaires des épidermes des pommes

Le groupement méthyle en position C29 se trouve soit sur le carbone C19 (acide ursolique), soit sur le carbone C20 (acide oléanolique) du cycle. D'un point de vue analytique, les isomères de position sont en règle générale mal séparés et résolus. Il est difficile de les quantifier séparément tant leur structure sont semblables. Mucaji et Nagy en 2011 [36] ont cependant développé une méthode par CCM capable de séparer les deux acides en deux spots très distincts. Dans notre étude, les acides oléanolique et ursolique et l'uvaol ont été quantifiés par CCMHP/UV-visible (Cf. protocole § 2. 7. 2 . g-). Dans les conditions opératoires mises au point, les deux acides ne sont pas suffisamment résolus pour être dosés séparément. En IR, les spectres des cuticules entières ont révélé la présence d'une bande C=O à 1693 cm^{-1} (acide oléanolique) plus intense que celle à 1716 cm^{-1} (acide ursolique) (Cf. § 3. 3. 1. A- Tableau II-5). Nous en avons conclu que, contrairement aux cires de surface (grattées au scalpel), l'acide oléanolique semblait majoritaire dans les cires totales. De plus, compte tenu de la similitude de réponses des deux isomères en CCMHP, la teneur en acides triterpéniques a été évaluée en équivalent d'acide oléanolique (Tableau II-7). La proportion relative d'acide ursolique et d'acide oléanolique sera évaluée par IRTF dans le paragraphe suivant.

Variété	VAR1	VAR2	VAR3
Teneur moyenne en acides triterpéniques (% massique de cires)	$24,7 \pm 0,7$	$36,8 \pm 2,7$	$39,0 \pm 0,5$
Teneur moyenne en uvaol (% massique de cires)	$4,7 \pm 0,1$	$3,7 \pm 0,2$	$4,3 \pm 0,1$
Teneur totale (% massique de cires)	$29,4 \pm 0,8$	$40,5 \pm 2,9$	$43,3 \pm 0,6$

Tableau II-7 : Teneurs moyennes en composés triterpéniques identifiés dans les cires totales des épidermes des pommes (Variétés 1,2 et 3).

La teneur la plus faible a été mesurée dans les cires totales de la Gala (VAR1), avec seulement 29 % massique. Les cires totales des deux autres variétés contiennent des quantités équivalentes d'acides triterpéniques à près de 40 % massique. Les teneurs en uvaol sont similaires dans les cires des trois variétés de pommes autour de 4 % massique. Les acides triterpéniques font partie des composés cycliques majoritaires dans les cires cuticulaires de pommes (variétés Cox et Worcester) (Cf. § I- 2. 2. 3.) (Lara *et al.* 2015 [25]). Jusqu'à 60 % d'acide ursolique a été quantifié dans les cires cuticulaires de pommes (Fernandes *et al.* 1964 [37]). Cependant, il faut noter que la teneur en acides triterpéniques est très variable d'un cultivar à l'autre (Lv 2016 [38]).

d- Evaluation du ratio acide ursolique/acide oléanolique par IRTF

La mesure de la hauteur des deux bandes d'absorption $\nu_{C=O}$ relatives à la fonction acide des acides ursolique à 1718 cm^{-1} et oléanolique à 1690 cm^{-1} a permis d'évaluer le ratio relatif des deux acides (Tableau II-8). La proportion des deux acides dans les cires totales a ainsi pu être calculée à partir des teneurs figurant dans le Tableau II-7.

Variété	VAR1	VAR2	VAR3
% acide ursolique	34 ± 1	35 ± 1	36 ± 1
% acide oléanolique	66 ± 1	65 ± 1	64 ± 1
<i>Teneur moyenne en acide ursolique (% massique de cires)</i>	8,4	12,9	14,0
<i>Teneur moyenne en acide oléanolique (% massique de cires)</i>	16,3	23,9	25,0

Tableau II-8 : Répartition des acides oléanolique et ursolique dans les cires cuticulaires totales des épidermes de pommes (Variétés 1, 2 et 3).

Quelle que soit la variété de pommes, l'acide oléanolique est l'acide triterpénique majoritaire à 65 % en moyenne des cires cuticulaires. Remarquons qu'il s'agit de la première étude dont les résultats montrent l'acide oléanolique comme majoritaire dans la composition des triterpénoïdes des cires de pommes. Il est majoritaire dans les cires cuticulaires du raisin par exemple représentant environ 30 % (Casado et Heredia 1999 [39]). Mais dans les cires cuticulaires de *Malus domestica*, l'acide ursolique est présenté dans la littérature comme le composé cyclique majoritaire. Il peut atteindre 98 % de l'ensemble des composés triterpéniques (Szakiel *et al.* 2012 [31], Fernandes *et al.* 1964 [37], Kolattukudi 1984 [40]).

e- Quantification des hydrocarbures aliphatiques par CPG/DIF

Les hydrocarbures aliphatiques de C5 à C40 ont été identifiés par CPG/DIF et CPG/SM (Cf. protocoles § 2. 7. 2. h-). Huit hydrocarbures ont été identifiés dans les cires cuticulaires totales des épidermes des pommes des trois variétés. Ils ont été quantifiés au moyen d'un étalonnage externe par CPG/DIF (Cf. protocole § 2. 7. 2. i-). Les résultats figurent dans le Tableau II-9.

Variété		VAR1	VAR2	VAR3
Teneur moyenne (% en masse de cires)	C23	0,028 ± 0,005	Tr	0,035 ± 0,006
	C24	0,026 ± 0,001	Tr	Tr
	C25	0,097 ± 0,018	0,037 ± 0,001	0,092 ± 0,010
	C26	0,043 ± 0,024	0,063 ± 0,002	0,038 ± 0,017
	C27	1,006 ± 0,074	0,254 ± 0,006	0,725 ± 0,030
	C28	0,161 ± 0,034	0,134 ± 0,007	0,141 ± 0,015
	C29	12,415 ± 2,617	5,882 ± 0,262	5,956 ± 0,337
	C32	0,152 ± 0,034	0,103 ± 0,014	0,049 ± 0,084
	Total	13,926 ± 2,805	6,474 ± 0,291	7,036 ± 0,499

Tableau II-9 : Teneur en hydrocarbures aliphatiques identifiés (C5-C40) dans les cires totales des épidermes des pommes (Variétés 1, 2 et 3).

Légende : Tr =traces.

Le nonacosane est l'hydrocarbure aliphatique majoritaire dans les cires totales des cuticules des trois variétés de pommes (près de 90 % massique de la composition en hydrocarbures aliphatiques identifiés). L'heptacosane représente en moyenne près de 10 % de la composition totale en hydrocarbures aliphatiques pour les variétés 1 et 3. Il ne représente que 4 % pour la variété 2. Les autres hydrocarbures représentent moins de 2 % de la composition totale en hydrocarbures aliphatiques (Figure II-19).

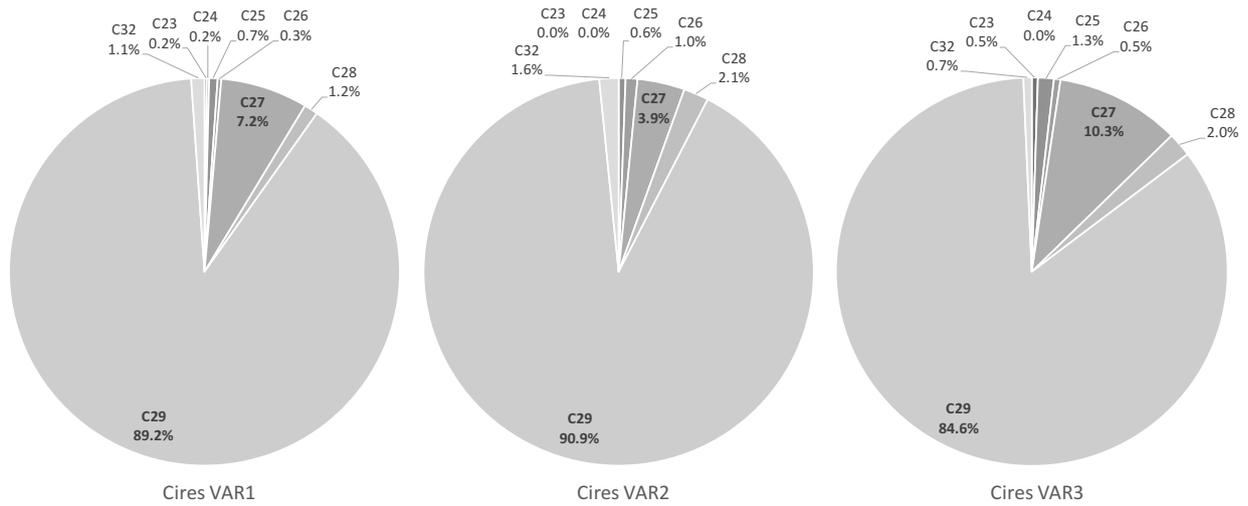


Figure II-19 : Répartition centésimale de la composition en hydrocarbures aliphatiques identifiés dans les cires cuticulaires totales des épidermes des pommes (Variétés 1, 2 et 3)

f- Mesure de l'angle de goutte des surfaces de peaux et relation avec la composition chimique moyenne des cires cuticulaires

Sachant qu'il existe une relation entre la morphologie des cristaux de cires, leur composition chimique et l'hydrophobie de surface des épidermes évalués à partir de la mesure de l'angle de goutte (Cf. § I- 2. 2. 3. c- et I- 2. 5. 1.), nous avons mesuré les angles de goutte sur la surface des épidermes de chacune des trois variétés de pommes et évalué par MEB la morphologie des cristaux de cires. Les résultats sont comparés à la composition moyenne en triterpénoïdes et en alcanes quantifiés dans les cires totales des cuticules correspondantes (Tableau II-10).

Variété	VAR1	VAR2	VAR3
Micrographes des surfaces de peaux fraîches (Cryo MEB)			
Aspect général des cires épicuticulaires	Plaquettes verticales	Plaquettes horizontales et tubules	Plaquettes enchâssées dans film continu
Angle de goutte moyen Θ (deg) à 25°C	104,5 ± 1,4	94,4 ± 6,0	80,8 ± 1,0
Teneur moyenne en triterpénoïdes (% massique de cires)	29,4 ± 0,8	40,5 ± 2,9	43,3 ± 0,6
Teneur moyenne en paraffines (% massique de cires)	13,9 ± 2,8	6,5 ± 0,3	7,0 ± 0,5
Teneur moyenne autres (esters, alcools gras, acides gras, cétones, aldéhydes, β -dicétones) en % massique de cires	56,7	53,0	49,7

Tableau II-10 : Relation entre structure des cristaux de cires épicuticulaires, angle de goutte et composition chimique des cires des épidermes de pommes (Variétés 1, 2 et 3)

Les résultats montrent que plus les cires sont riches en triterpénoïdes et plus l'angle de goutte est faible (variétés 2 et 3), tandis que plus elles sont riches en alcanes, plus l'angle de goutte est élevé (variété 1). Holloway en 1969 [41] a mesuré les angles de goutte Θ à la surface d'une lame de verre lisse recouverte des différents composés chimiques des cires. Le caractère hydrophobe est liée à la polarité des molécules. Plus les cires sont riches en alcanes, esters, cétones et alcools secondaires à longue chaîne, plus la surface est hydrophobe ($\Theta > 100^\circ$). Les cires riches en alcools primaires sont un peu moins hydrophobes ($\Theta \sim 94-95^\circ$). L'acide ursolique est beaucoup moins hydrophobe que l'ensemble des autres composés ($\Theta = 89^\circ$), à l'exception des diols ($\Theta = 70^\circ$). Selon Holloway, les surfaces dont les angles de gouttes sont inférieurs à 90° ne sont pas recouvertes d'une couche prédominante de cires. Le caractère plus hydrophile fait intervenir des composés plus polaires (cutine, pectines et cellulose). Dans le cas d'angles de gouttes compris entre 90 et 110° , les cires sont prépondérantes et jouent un rôle significatif dans les propriétés hydrophobes de surface. Pour des angles supérieurs à 110° , d'autres propriétés interviennent telles que la rugosité. En résumé, si la surface d'un végétal est recouverte d'une couche lisse de cires, l'angle de goutte est au moins égal à 90° (Holloway 1969 [41] et 1969-2 [42]).

Néanmoins, les cires étant un mélange complexe de ces différents composés, leur morphologie est très variable et la mouillabilité dépend de leur distribution (Barthlott *et al.* 1998 [8], Hall 1966 [43]). L'étude des micrographes des surfaces des épidermes des trois variétés de pommes a mis en évidence trois distributions distinctes (Tableau II-10). La surface des pommes Gala (VAR1) est hérissée par de très nombreux cristaux sous la forme de plaquettes verticales. Les épidermes de pommes Fuji (VAR2) sont caractérisés par une surface plutôt irrégulière mais très différente de celle de la Gala. En effet, elle est recouverte de cristaux sous la forme de plaquettes mais organisées plutôt horizontalement. On distingue à différents endroits des cristaux sous la forme de tubules. La surface des pommes Pink Lady® (VAR3) est caractérisée par une couche lisse de cires de laquelle émergent quelques reliefs, attribués aux crêtes de cristaux en forme de plaquettes. Plus la distribution des cires est transversale, plus l'angle de goutte est élevé. Koch *et al.* ont proposé un classement de la mouillabilité de surface des végétaux en quatre catégories : hydrophobe ($90^\circ < \Theta < 150^\circ$), hydrophile ($10^\circ < \Theta < 90^\circ$), superhydrophobe ($\Theta \geq 150^\circ$) et superhydrophile ($0^\circ < \Theta < 10^\circ$) (Koch *et al.* 2008 [44]). La mouillabilité est liée à deux paramètres : la distribution des cires et la morphologie des cellules épidermiques. Dans le cas des surfaces hydrophobes, les cellules sont recouvertes d'une distribution de cires en 3D tandis que les cellules des surfaces hydrophiles sont caractérisées par une distribution des cires en 2D, représentée par un film fin de cires dans l'axe longitudinal. Dans ce cas, les distributions en 3D sont relativement faibles.

En conclusion, les surfaces des pommes Gala et Fuji sont hydrophobes. La surface des pommes Pink Lady® est hydrophile, caractérisée majoritairement par un film de cires (distribution longitudinale 2D avec peu de cristaux en 3D) riche en acides triterpéniques. Remarquons que plus la concentration en acides triterpéniques augmentent (VAR1 < VAR2 < VAR3), plus la structure de la surface est lisse (2D) et plus la surface présente un caractère hydrophile. Cependant, il faut noter que la mouillabilité des surfaces recouvertes de cristaux à disposition verticale 3D (plaquettes, tubules) tend à augmenter car les cristaux se brisent facilement sous l'effet d'une abrasion (Hall 1966 [43]).

Concernant le bilan matière des cires cuticulaires, seuls les alcanes, les acides triterpéniques (acides ursolique et oléanolique) et l'uvaol ont pu être identifiés. La présence d'alcools gras primaires n'a pas été décelée. La présence de squalène a été infirmée par une analyse par CPG/SM. Dans la méthode

CPG (Cf. paramètres § 2. 7. 2. h-), le squalène ($IR^1 = 2808$ sur DB-5ms) est pratiquement co-élué avec l'octacosane ($IR = 2800$). L'analyse du spectre de masse correspondant dans les extraits de cires analysés confirment l'identité de l'alcane en C28. Des traces de sucres libres et d'acides organiques dans les cires obtenues à partir des épidermes lysés ont été recherchées. Des extraits aqueux des cires, obtenus selon le protocole décrit dans le paragraphe 2. 7. 2. j-, ont été analysés par CIHP. Aucun acide organique n'a été détecté et des faibles quantités de sucres libres ont été mesurées : la teneur totale ($n = 2 \times 2$) est inférieure à 0,2 % massique : $0,17 \pm 0,04$ % dans les cires totales de VAR1; $0,09 \pm 0,02$ % dans celles de VAR2 et $0,12 \pm 0,00$ % dans celles de VAR3. Les teneurs en esters ont été évaluées après saponification, extraction liquide-liquide et dérivatisation (Silyl 991 pour les alcools gras et TMSH pour les acides gras) selon un protocole interne utilisé en routine au laboratoire et selon le protocole décrit par Verardo *et al.* en 2003 [12] (Cf. § 2. 7. 2. k-). Les deux extraits ont été analysés par CPG/DIF et CPG/SM. Les résultats obtenus ne permettent pas de conclure à la présence d'esters d'acides gras et d'alcools gras. En particulier, les spectres de masse de l'insaponifiable (alcools) sont typiques d'esters triméthylsilylés et non d'alcools triméthylsilylés. Il n'est peut-être pas judicieux de procéder à la saponification des esters de cires directement dans le *totum* des cires en raison des interactions et des effets de dilution et de compétition dus aux autres composés. Dans la littérature, la saponification est effectuée sur des extraits purifiés sur colonne. Nous reviendrons sur l'identification des esters de cires dans le paragraphe 3. 3. 2. 3. concernant l'extraction séquentielle des cires cuticulaires. Les teneurs en alcools gras secondaires, acides gras libres, β -dicétones ou diols n'ont pas été quantifiées. Un dosage gravimétrique des différents composés après séparation chromatographique par CCMHP (Figure II-17) et prélèvements aurait pu être envisagé. Cependant, la détermination gravimétrique conduit à des teneurs souvent surestimées par rapport à celles évaluées par des techniques chromatographiques Schreiber et Schönherr 2009 [45]).

En conclusion, dans notre étude, les teneurs – évaluées par chromatographie – en composés triterpéniques identifiés dont l'acide oléanolique est la majoritaire et en alcanes dans les cires totales d'épidermes de pommes obtenus après lyse enzymatique varient de 43 à 50 % massique selon les variétés. Dans la littérature, l'acide ursolique et les alcanes sont les composés prédominants représentant 70 à 90 % des composés identifiés (Lara *et al.* 2015 [25], Kolattukudi 1984 [40]).

3. 3. 2. 2. Distinction entre cires épicuticulaires et cires intracuticulaires

Les compositions chimiques des cires épicuticulaires et intracuticulaires ainsi que de leurs cristaux ne sont pas identiques (Cf. § I- 2. 2. 3. c-, d- et e-). Nous avons évalué dans cette partie la faisabilité des méthodes identifiées dans la littérature et visant à différencier les catégories de cires en vue de leur caractérisation (Cf. § I- 2. 3. 1.). En particulier, les méthodes mécaniques d'extraction de la voie 3 sont présentées dans la littérature comme sélectives des cires épicuticulaires. La voie 3 a donc été mise en œuvre sur des pommes Fuji (VAR2). Les cires épicuticulaires des épidermes de Fuji ont été extraites selon trois protocoles détaillés dans le paragraphe 2. Matériels et méthodes :

- 1- par friction de la surface au moyen d'un treillis métallique souple (Cf. § 2. 5. 1.),
- 2- par adhésion sur un film de gomme arabique (Cf. § 2. 5. 2.),
- 3- par cryo-adhésion sur du glycérol (Cf. § 2. 5. 3.).

¹ IR : indice de rétention

Les extraits obtenus sont analysés par CCMHP/UV-Visible et IRTF (Figure II-20).

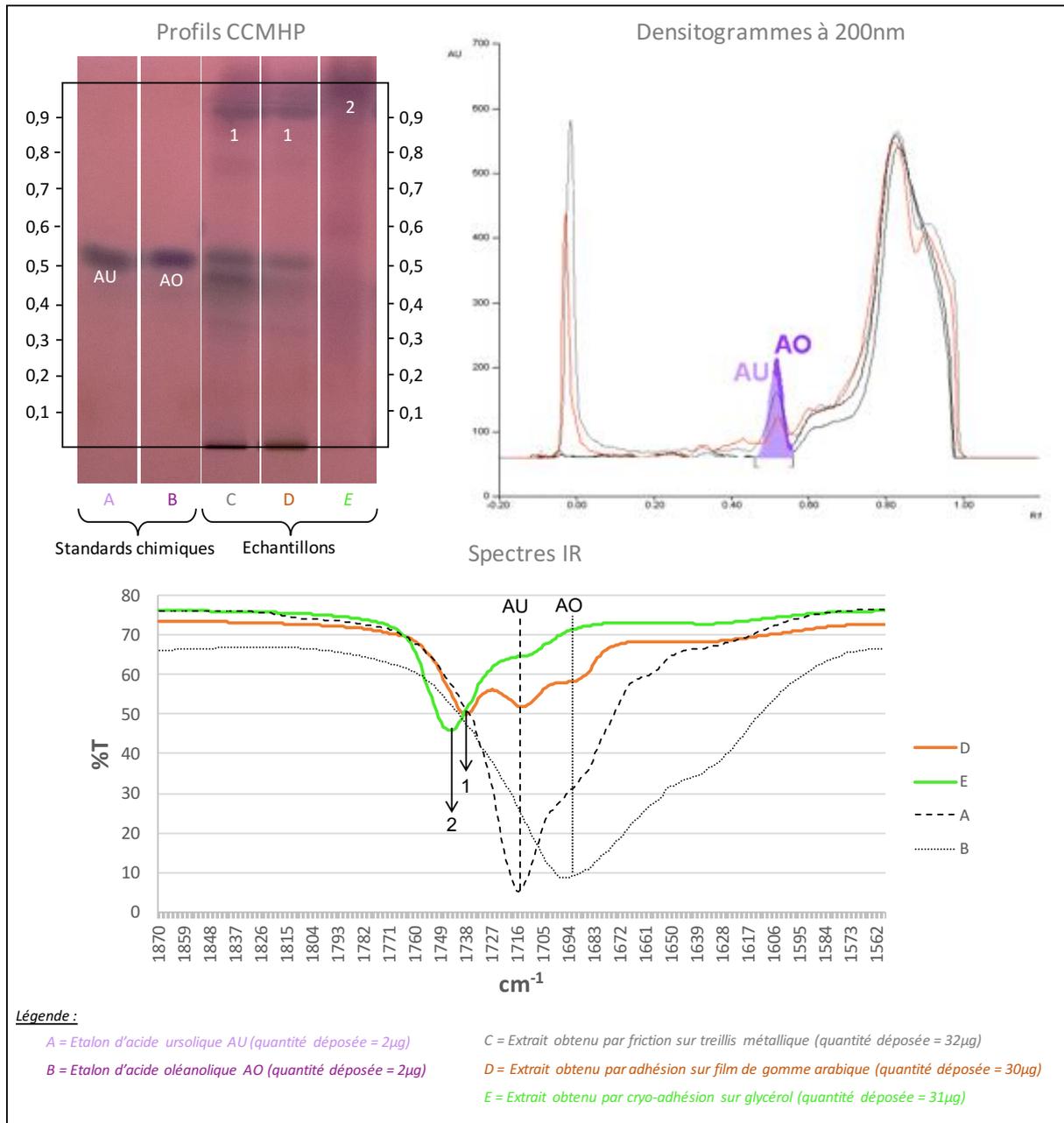


Figure II-20 : Profils CCMHP après dérivatisation à la vanilline sulfurique, densitogrammes associés avant dérivatisation à 200nm et spectres IRTF des extraits de cires épicuticulaires par extractions mécaniques (VAR2)

D'après les profils chromatographiques des extraits de cires, les acides triterpéniques ont été détectés dans les extraits obtenus par friction (C) et adhésion sur film (D). Sur les densitogrammes, l'aire relative aux acides dans l'échantillon (C) est plus grande que celle dans l'échantillon (D). La quantité d'acides triterpéniques extraite par friction est plus élevée que celle extraite par adhésion sur film. L'extrait par cryoadhésion (F) ne contient pas d'acides détectables. Néanmoins une analyse par IRTF a révélé la présence de bandes C=O acides à 1694 et 1716 cm^{-1} relatives aux acides oléanolique (AO) et ursolique (AU) respectivement, dans l'échantillon de cires obtenues par adhésion sur film (D). Une bande C=O ester à 1737 cm^{-1} est également présente. L'analyse par IRTF de l'échantillon de cires obtenues par cryo-adhésion (E) met en évidence une bande fortement majoritaire C=O ester à 1745 cm^{-1} ainsi qu'un

épaulement vers 1716 cm^{-1} relatif à la présence de traces d'acide ursolique. Il est intéressant de constater que la bande C=O ester ne présente pas le même déplacement dans tous les échantillons. En se référant aux profils chromatographiques, l'existence de deux Rf a pu être constatée : le composé 1 à $R_f = 0,85$ et le composé 2 à $R_f = 0,95$. En IRTF, la vibration d'élongation de la liaison C=O ester du composé 1 est à 1737 cm^{-1} tandis que celle du composé 2 est à 1745 cm^{-1} . Notons que la bande ester à 1737 cm^{-1} est systématiquement liée à la présence des acides dans les extraits. La possibilité de liaisons hydrogènes avec les protons labiles des acides triterpéniques peut expliquer le déplacement de la bande ester initialement à 1745 cm^{-1} (effet bathochrome). Dans les cires totales, la bande ester est également identifiée à 1739 cm^{-1} (Tableau II-4). Ces mêmes liaisons hydrogène peuvent aussi expliquer la différence des Rf en chromatographie.

Dans la littérature, les acides triterpéniques sont considérés comme des marqueurs des cires intracuticulaires (Buschhaus et Jetter 2011 [9], Jetter *et al.* 2000 [47], Frighetto *et al.* 2008 [47]). Par conséquent, il semblerait que les méthodes d'extraction par friction et par adhésion sur film de gomme arabique ne soient pas totalement sélectives puisqu'une quantité significative d'acides triterpéniques a pu être détectée. La friction de la surface avec une grille métallique exerce à la fois une pression et une abrasion probablement suffisantes pour rendre accessible une partie des cires intracuticulaires et donc des acides triterpéniques. L'extraction par adhésion sur film consiste à déposer à la surface des épidermes une solution aqueuse de gomme arabique et à la laisser sécher. Il est possible qu'une extraction chimique des acides triterpéniques ait lieu au cours du temps de séchage des films. Seule la méthode par cryo-adhésion est suffisamment sélective pour minimiser les quantités d'acides extraits. La méthode est rapide (le temps de pose du glycérol est très court) et la congélation de l'échantillon fige probablement les composés qui n'ont pas le temps de s'extraire par voie chimique dans le glycérol. Toutefois sa mise en œuvre est délicate sur une surface sphérique. Il faut découper des carrés d'épiderme de 1 cm^2 en ayant soin de conserver l'intégrité de la surface. Malgré tout, l'adhésion n'est pas toujours efficace : les carrés d'épidermes se décollent souvent au moment de l'immersion dans l'azote liquide. Pour être représentatif de la totalité des cires épicuticulaires, il faut compter cinq cryo-adhésions successives de la surface.

Il existe une dernière technique répertoriée dans la littérature comme sélective des cires épicuticulaires. Il s'agit d'une immersion très rapide dans un solvant généralement plutôt apolaire. Elle sera présentée dans le paragraphe suivant puisqu'étant intégrée dans la voie 4 de fractionnement des épidermes de pommes de la Figure II-4.

3. 3. 2. 3. Evaluation de l'extraction des cires épicuticulaires par immersion dans des solvants

A l'instar des extractions mécaniques, les extractions par immersion rapide des fruits entiers dans certains solvants (hexane, chloroforme) sont identifiées dans la littérature comme sélectives des cires épicuticulaires. Nous avons donc procédé à une extraction des cires par immersion de pommes Fuji (VAR2) dans l'hexane variant de 2 à 15 minutes (Cf. protocole § 2. 6.). Les extraits ont été analysés par CCMHP/UV-Visible et par IRTF. Les résultats sont présentés dans la Figure II-21.

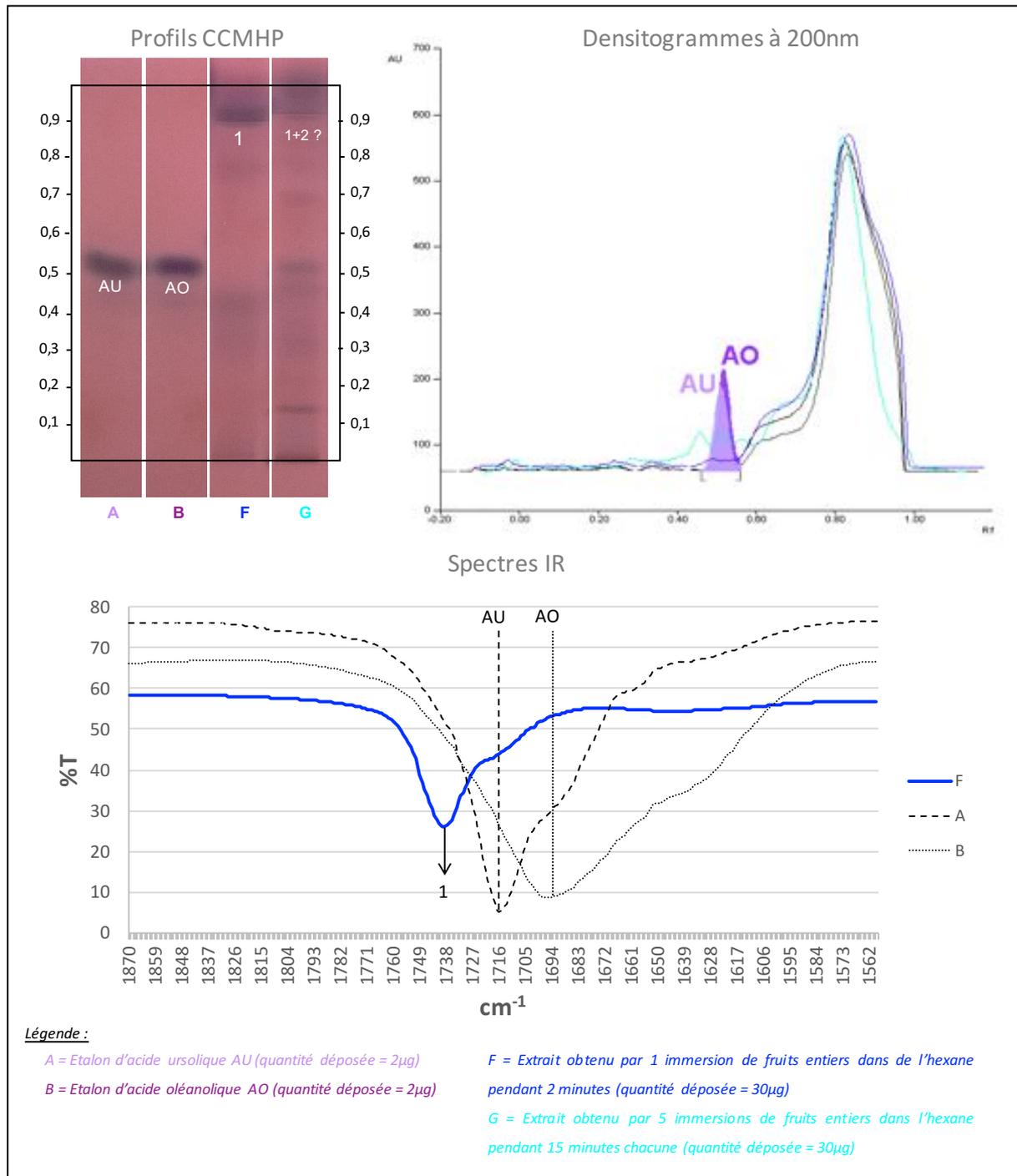


Figure II-21 : Profils CCMHP après dérivatisation à la vanilline sulfurique, densitogrammes associés avant dérivatisation à 200nm et spectres IRTF des extraits de cires épicuticulaires par immersion dans l'hexane (VAR2)

Les profils chromatographiques montrent que plus les extractions sont longues et répétées, plus les acides triterpéniques sont extraits (G). En revanche, ils ne sont pas détectés dans l'échantillon F qui correspond à une immersion plus courte de 2 minutes. Cependant, l'analyse de F par IRTF met en évidence l'existence d'un épaulement significatif à 1716 cm⁻¹, correspondant à la bande C=O de l'acide ursolique d'une part, et d'une bande C=O ester à 1739 cm⁻¹ d'autre part. Or, d'après les résultats précédents (Cf. § 3. 3. 2. 2.), cela correspondrait à un ester lié par liaison hydrogène aux acides triterpéniques. Une analyse par MEB de la surface des épidermes des trois variétés de pommes avant et après immersion de 2 minutes dans l'hexane a été effectuée. Les micrographes révèlent que toutes

les surfaces ont été altérées par le solvant. Il semble que les couches superficielles soient comme soulevées et de nombreuses cavités sont apparues (Figure II-22). Les couches plus internes de cires peuvent donc être accessibles au solvant. Et nous constatons clairement qu'une immersion prolongée dans l'hexane contribue significativement à extraire les acides triterpéniques (G).

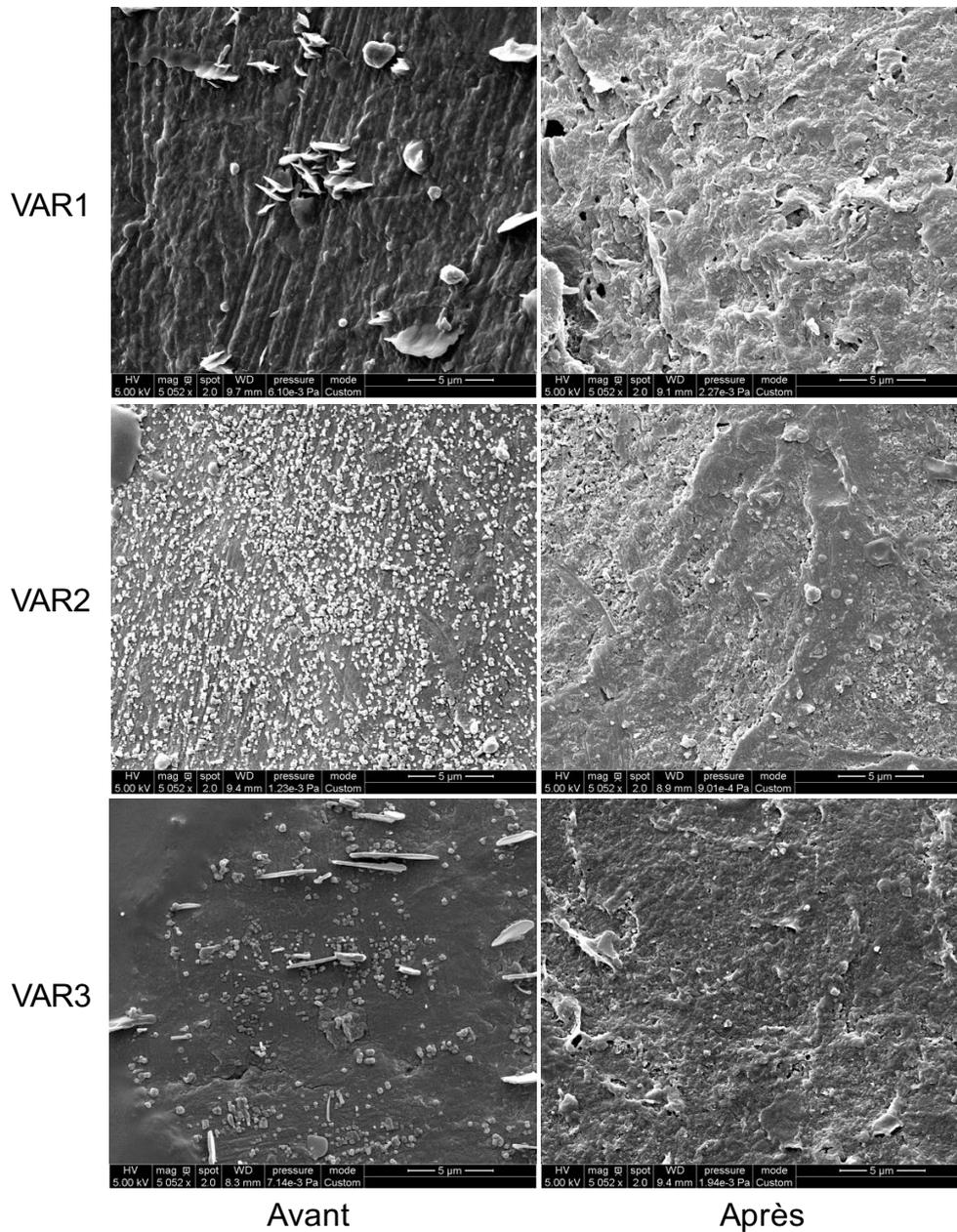


Figure II-22 : Micrographes des surfaces des épidermes de pommes avant et après immersion des fruits entiers de 2 minutes dans l'hexane

Cette méthode de « lavage chimique » a été décrite de nombreuses fois dans la littérature comme sélective des deux catégories de cires, épi- et intracuticulaires (Cf. § I- 2. 3. 1.). Mais contrairement à ce que certains auteurs ont pu démontrer (Buschhaus et Jetter 2011 [9], Jetter *et al.* 2000 [46]), les conditions d'extraction douces (extractions superficielles, fonction de la nature des solvants, de la température et de la durée d'extraction) ne libèrent pas uniquement les composés épicuticulaires. La séparation chimique des cires épicuticulaires des autres cires ne peut pas être totalement sélective. Malgré le développement des extractions par adhésion dans les années 80 et par cryo-adhésion à la

fin des années 90, elle est encore très utilisée, sûrement en raison de sa mise en œuvre simple et facile. En revanche, les différents composés des cires (alcane, alcools, acides esters...) peuvent être discriminés lors des extractions par solvants. De cette façon, un premier fractionnement peut avoir lieu, fondé sur les différences de polarité des composés des cires. Dans ce cadre-là, nous avons sélectionné trois solvants de polarité distincte et avons procédé aux extractions selon les protocoles décrits dans le paragraphe 2.6.

3. 3. 2. 4. Optimisation du fractionnement des cires cuticulaires par immersions successives des pommes entières dans l'hexane, le chloroforme et le méthanol

La voie 4 de fractionnement des épidermes de pommes (Figure II-4) est intéressante en ce sens qu'elle décrit un schéma de fractionnement des composés des cires cuticulaires en fonction de leur polarité à partir de la mise en œuvre d'extractions successives avec des solvants de polarité croissante.

Nous avons optimisé les extractions dans les trois solvants sélectionnés (hexane, chloroforme et méthanol) à partir des pommes Fuji (VAR2) afin de fractionner les composés des cires par polarité, de façon à faciliter dans un second temps leur caractérisation chimique. Pour chaque essai, dans un premier temps, le rendement d'extraction exprimé en μg de cires extraites par cm^2 d'épiderme est représenté en fonction de la durée d'immersion en minutes. La durée optimale est fixée lorsque l'asymptote est atteinte. Dans un second temps, le rendement est représenté en fonction du nombre d'extraction dont la durée a été définie précédemment. Le nombre optimal d'extractions correspond à l'asymptote. Dans le paragraphe suivant (Cf. 3. 3. 2. 5.), la caractérisation chimique des extraits par CCMHP/UV-Visible et par IRTF sera présentée et discutée.

a- Optimisation des extractions par immersion dans l'hexane

Les pommes entières ont été immergées dans l'hexane pendant des durées variables. Les courbes de la Figure II-23 représentent le rendement en cires extraites évaluées en μg par cm^2 de surface de pommes en fonction de la durée d'immersion dans le solvant en minutes et du nombre d'immersions pour des durées fixées. Le rendement d'extraction moyen peut être atteint pour une durée d'immersion de 15 minutes. Doubler la durée d'immersion ne conduit pas à une augmentation significative du rendement d'extraction (environ 10 %).

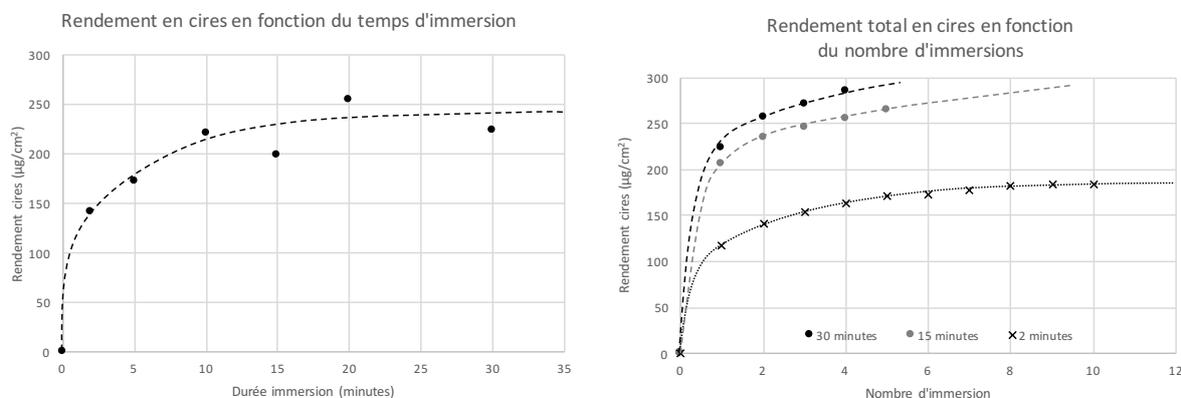


Figure II-23 : Optimisation des extractions des cires par immersion dans l'hexane

La durée d'immersion dans l'hexane a donc été fixée à 15 minutes et le nombre d'immersions à 5.

b- Optimisation des extractions par immersion dans le chloroforme après immersion hexane

A la suite des 5 immersions de 15 minutes dans l'hexane, les fruits sont soumis à une extraction par immersion dans le chloroforme. La courbe représentant le rendement en cires en fonction de la durée d'immersion montre que la durée optimale d'immersion dans le chloroforme est de 30 minutes. Dans un second temps, le nombre d'immersions de 30 minutes a été optimisé et fixé à 4 (Figure II-24).

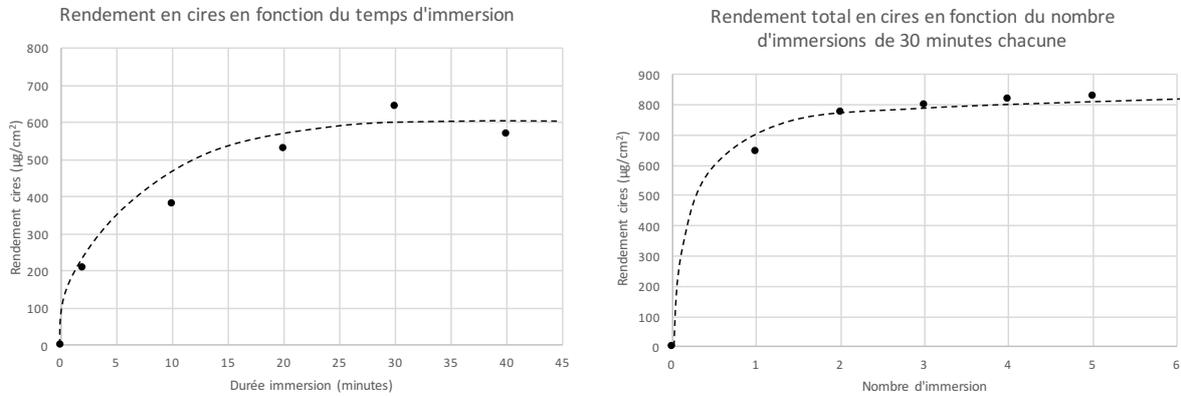


Figure II-24 : Optimisation des extractions des cires par immersion des fruits dans le chloroforme après immersions dans l'hexane (5 immersions de 15 minutes)

Le rendement maximum est donc obtenu pour 4 immersions de 30 minutes dans le chloroforme.

c- Optimisation des extractions par immersion dans le méthanol après immersions hexane + chloroforme

A la suite des 5 immersions de 15 minutes chacune dans l'hexane suivies de 4 immersions de 30 minutes chacune dans le chloroforme, les fruits sont assez dégradés (Figure II-25). Ils subiront pour finir seulement 3 extractions de 30 minutes chacune dans le méthanol.

Avant immersions :



Après 5 immersions dans l'hexane et 4 immersions dans le chloroforme :



Figure II-25 : Aspects des pommes au cours des immersion successives dans les solvants

3. 3. 2. 5. Caractérisation chimique des trois séries d'extraits de cires cuticulaires des trois variétés de pommes

Dans cette partie, les extraits de cires ont été préparés selon les protocoles décrits dans le paragraphe 2. 6. Trois séries d'extractions successives ont été réalisées pour les trois variétés de pommes à partir des essais d'optimisation précédents (Cf. 3. 3. 2. 4.) : 5 extractions de 15 minutes dans l'hexane, suivies de 4 extractions de 30 minutes dans le chloroforme puis de 3 extractions de 30 minutes dans le méthanol. Les extraits ont été analysés par CCMHP/UV-Visible et par IRTF. Les résultats seront discutés et les teneurs en composés majoritaires de chaque série d'extraits seront évaluées selon la méthode adaptée (CCMHP/UV-Visible, CPG, CIHP).

a- Les rendements en cires :

Les différents rendements en lipides cuticulaires solubles des trois séries d'extraits de cires dans l'hexane, le chloroforme et le méthanol ont été calculés et figurent dans le Tableau II-11.

Variété	VAR1	VAR2	VAR3
Nombre pommes	3 x 6	3 x 5	3 x 5
Masse pommes (kg)	2,0078	2,0752	2,2091
Surface totale moyenne pommes (cm ²)	2147,1	1932,31	2155,18
Masse totale extrait hexane (g)	0,79	0,57	0,85
Masse totale extrait CHCl ₃ (g)	1,41	1,56	2,11
Masse totale extrait MeOH (g)	9,85	4,18	14,31
Rendement total extrait hexane (µg/cm ²)	0,368	0,295	0,394
Rendement total extrait CHCl ₃ (µg/cm ²)	0,657	0,807	0,979
Rendement total extrait MeOH (µg/cm ²)	4,588	2,163	6,640
Rendement total cumulé (µg/cm ²)	5,613	3,715	8,013

Tableau II-11 : Evaluation des rendements en cires des trois séries d'extraits par immersion dans des solvants de pommes entières (Variétés 1, 2 et 3)

Nous remarquons que quelle que soit la variété, les rendements des extraits dans l'hexane sont du même ordre de grandeur entre 0,3 et 0,4 µg/cm², de même que ceux obtenus dans le chloroforme entre 0,7 et 1 µg/cm², soit deux fois plus en moyenne que les rendements obtenus dans l'hexane. La plus grande différence entre les variétés est observée pour les extraits dans le méthanol : 2 µg/cm² pour la Fuji (VAR2) contre 5 µg/cm² et 7 µg/cm² pour les variétés Gala (VAR1)1 et Pink Lady® (VAR3) respectivement.

b- Caractérisation chimique des extraits dans l'hexane des cires de pommes

Afin d'identifier les différents composés solubilisés au cours des immersions, les extraits obtenus successivement dans l'hexane, le chloroforme et le méthanol ont été analysés. La présence d'esters mais également d'acides triterpéniques a été évaluée dans les extraits de cires à l'hexane par CCMHP/UV-Visible et par IRTF (Figure II-26).

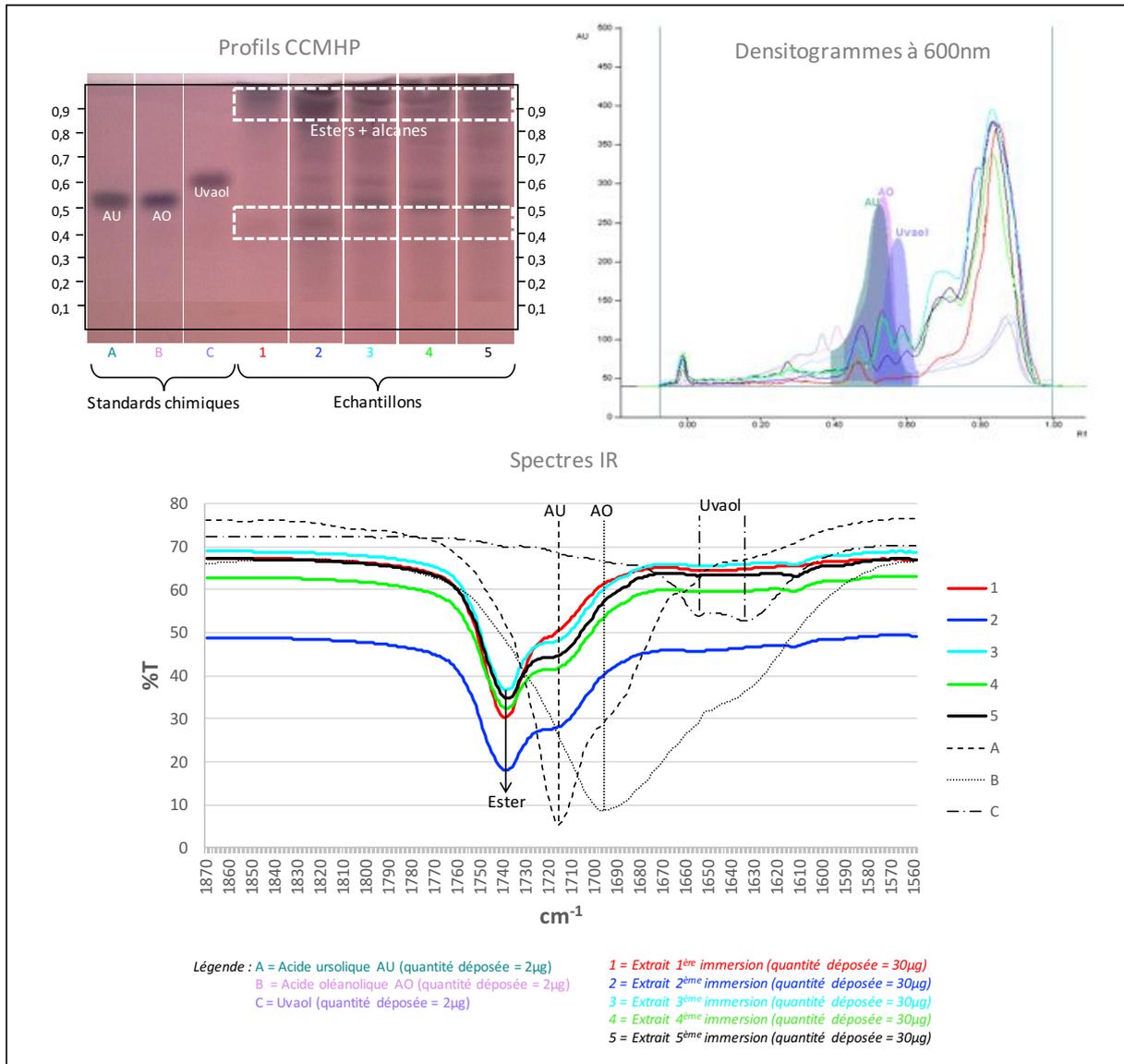


Figure II-26 : Caractérisation chimique des extraits de cires dans l'hexane par CCMHP/UV-Visible et par IRTF (Variété 2)

Le suivi analytique par CCMHP et IRTF de chacune des cinq immersions successives (1 à 5) des fruits entiers dans l'hexane a révélé l'extraction de trois familles de composés.

Les esters ont été identifiés à $R_f = 0,85 - 0,90$. Sur le spectre IR, la bande $\nu_{\text{C=O}}$ est à 1739 cm^{-1} . Ces valeurs correspondent à des esters liés par liaisons hydrogène avec des acides triterpéniques (Cf. § 3. 3. 2. 2.).

Les acides triterpéniques sont effectivement détectés à $R_f = 0,54$, à partir de l'extrait 2 par CCMHP/UV-Visible mais dès l'extrait 1 par IRTF. En effet, un épaulement à 1716 cm^{-1} est visible dans le spectre de l'extrait 1. Il s'intensifie au fur et à mesure des extractions, de même que l'aire du pic correspondant dans les densitogrammes. Notons que la bande acide C=O relative à l'acide oléanolique à 1696 cm^{-1} n'est pas détectée dans les extraits.

Enfin, des hydrocarbures aliphatiques ont été détectés par CCMHP. Mais le co-développement avec les esters oblige à les quantifier par une autre technique (CPG).

En conclusion, l'immersion des pommes entières dans l'hexane extrait majoritairement des esters et des alcanes ainsi que de l'acide ursolique. Nous avons déjà observé que l'acide ursolique était présent dans les cires grattées au scalpel à la surface des pommes et analysées par IRTF alors que l'acide oléanolique n'était pas détecté (Cf. Tableau II-5).

Les hydrocarbures aliphatiques et les triterpénoïdes ont été quantifiés par CPG/DIF et CCMHP/UV-Visible respectivement (Tableau II-12). Ces extraits se présentent sous la forme de cristaux blancs. La teneur en hydrocarbures aliphatiques représente entre 20 et 40 % en masse des extraits. Cela paraît conforme aux données de la littérature. Puisque les hydrocarbures aliphatiques se concentrent dans les cires épicuticulaires (Buschhaus et Jetter 2011 [9]), ils sont accessibles dès les premières extractions par l'hexane. Verardo *et al.* en 2003 [12] ont identifié entre 29 et 41 % d'alcane dans des extraits de cires épicuticulaires après immersion de pommes entières dans l'hexane (Cf. § I- 2. 3. d-). A l'instar des cires totales (Tableau II-9 et Figure II-19), les hydrocarbures en C27 et C29 représentent plus de 95 % des hydrocarbures totaux identifiés dans les extraits à l'hexane. Quant aux acides triterpéniques, ils représentent entre 1,6 et 4,7 % en masse des extraits à l'hexane. L'uvaol n'a pas été détecté.

Nous avons supposé d'après l'analyse des profils CCMHP (Figure II-26) que, dans les extraits à l'hexane, aucun autre composé hormis les esters n'était présent en quantité significative. Nous avons donc estimé la teneur en esters par extrapolation à 100 % du bilan matière des extraits à l'hexane. Les valeurs obtenues sont vraisemblablement surestimées mais l'erreur a été considérée comme négligeable. Elles sont comprises entre 60 et 80 % de la masse totale d'extrait. Les analyses des extraits de cires de pommes à l'hexane des travaux de Verardo *et al.* en 2003 [12] mettent en évidence des taux d'esters très faibles mais aussi assez variables d'un cultivar à l'autre : entre 1,9 et 14,7 % en masse des extraits. Des alcools secondaires compris entre 0 et 23 % et des acides gras libres entre 16 et 21 % font partie des composés majoritaires identifiés dans ces extraits. Les auteurs ont attribué les bandes C=O en IR entre 1780 et 1680 cm^{-1} à la présence d'esters et d'aldéhydes et/ou de cétones. Notons toutefois que les extraits qu'ils ont obtenus correspondent à six immersions successives de pommes Florina, Golden B et Ozark Gold, dans de l'hexane pendant 24 heures, générant 3 g d'extraits secs, soit environ 4 fois plus que les quantités d'extraits secs que nous avons obtenues après 5 immersions successives de 15 minutes dans l'hexane. Nous avons observé que plus le temps et le nombre d'immersions augmentent, plus la quantité d'acides triterpéniques extraite augmente. Il est probable que les 6 immersions de 24 heures qu'ont effectuées Verardo *et al.* extraient des composés plus polaires que les esters tels que les alcools, les aldéhydes..., minimisant ainsi leur pourcentage massique dans l'extrait hexane.

Variété	VAR1	VAR2	VAR3
Aspect des extraits secs hexane	Cristaux blancs		
Teneur totale en hydrocarbures aliphatiques (% massique d'extrait hexane)	38,6	17,7	21,8
% C23	0,12	0,05	0,07
% C24	0,07	0,32	0,02
% C25	0,29	0,11	0,30
% C26	0,07	0,23	0,05
% C27	3,16	0,84	2,81
% C28	0,45	0,43	0,44
% C29	34,44	15,69	18,15
Autres (C5-C22, C30-C40)	nd	nd	nd
Teneur moyenne en triterpénoïdes totaux (% massique d'extrait hexane)	1,6 ± 0,0	2,9 ± 0,2	4,7 ± 0,2
% acides triterpéniques	1,60 ± 0,04	2,94 ± 0,16	4,67 ± 0,18
% uvaol	nd	nd	nd
Teneur maximale moyenne déduite en esters (% massique d'extrait hexane)	59,8	79,4	73,5
Masse maximale d'esters dans les extraits hexane (g)	0,47	0,45	0,62

Tableau II-12 : Teneurs moyennes en hydrocarbures aliphatiques, triterpénoïdes et esters des extraits de cires dans l'hexane (Variétés 1, 2 et 3).

Légende : nd = non détectés

Afin d'identifier la nature des esters des cires, les extraits à l'hexane ont été soumis à une saponification (Cf. protocoles § 2. 7. 2. k-) et les résidus insaponifiables (alcools gras) et saponifiables (acides gras) ont été analysés par CPG/DIF et CPG/SM (Cf. protocoles § 2. 7. 2. h-).

L'analyse de la fraction insaponifiable par CPG/SM a révélé la présence majoritaire de quatre composés : palmitate (C16:0), stéarate (C18:0), un composé non identifié ($m/z = 73$ (TMS), 229, 369 majoritaires) sous la forme inattendue d'esters triméthylsilylés ainsi que le nonacosane. La présence des esters triméthylsilylés à ces teneurs dans cet échantillon demeure inexpliquée. Le spectre IR montre une forte diminution de la bande ester à 1739 cm^{-1} entre l'extrait initial et la fraction insaponifiable (Figure II-27). Le spectre IR de la fraction saponifiable présente deux bandes : une bande C=O ester à 1738 cm^{-1} , plus intense que celle de la fraction insaponifiable mais moins que l'extrait avant saponification, ainsi qu'une bande C=O acide à 1711 cm^{-1} qui a été attribuée à l'acide ursolique (à 1716 cm^{-1} dans le spectre de l'extrait initial).

c- Caractérisation chimique des extraits dans le chloroforme des cires de pommes

La présence d'acides triterpéniques a été évaluée dans les extraits de cires dans le chloroforme par CCMHP/UV-Visible et par IRTF (Figure II-28).

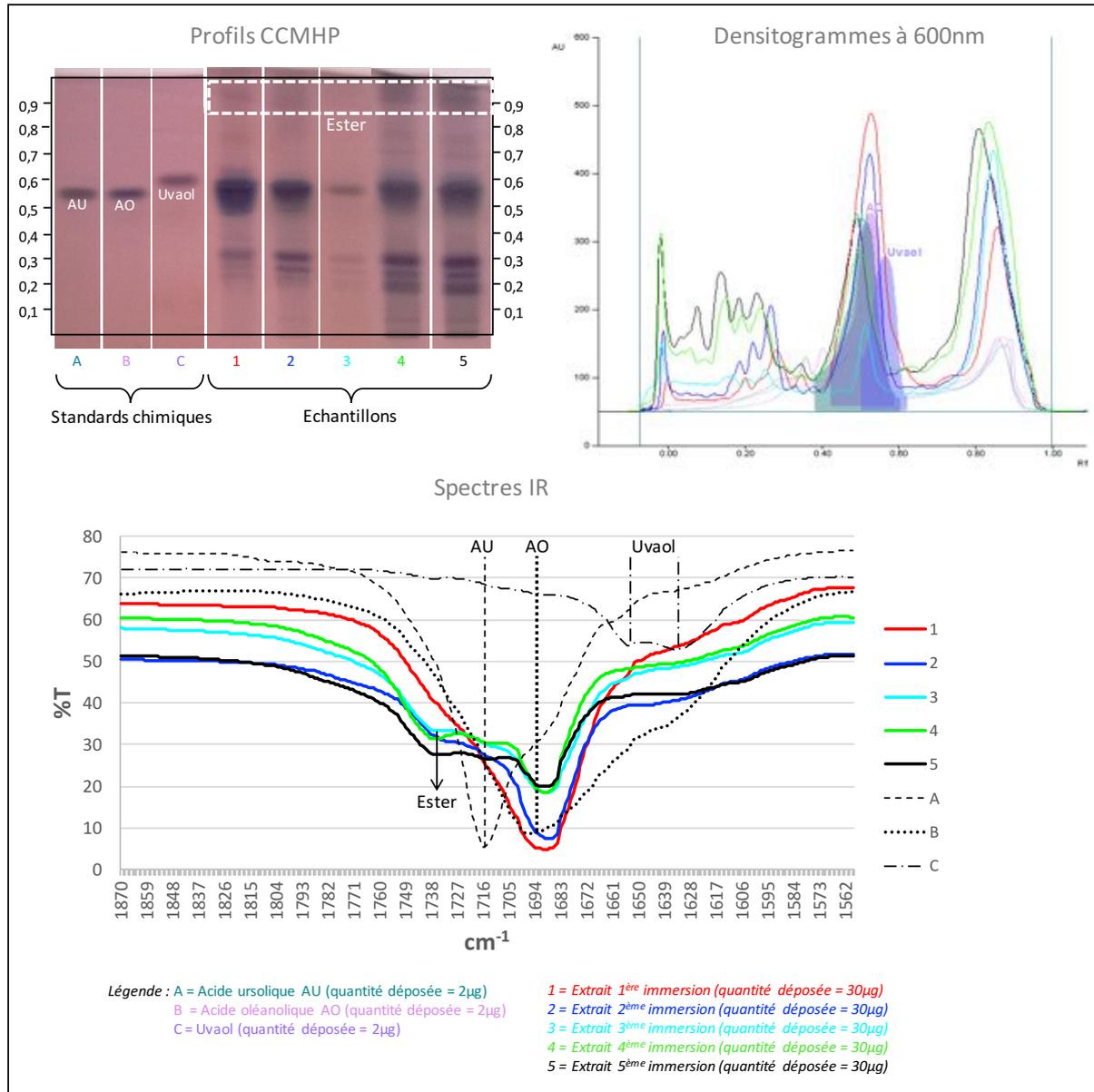


Figure II-28 : Caractérisation chimique des extraits de cires dans le chloroforme par CCMHP/UV-Visible et par IRTF (Variété 2)

Le suivi analytique par CCMHP et par IRTF de chacune des cinq immersions successives (1 à 5) des fruits entiers dans le chloroforme conduit à une extraction majoritaire des composés triterpéniques à Rf ~ 0,5-0,6. L'uvaol est également extrait : des épaulements du pic d'acides triterpéniques sont visibles dans les densitogrammes à Rf = 0,6. Les bandes IR caractéristiques de l'uvaol à 1654 et 1634 cm^{-1} de faible intensité sont difficilement identifiables dans les spectres des extraits. L'acide oléanolique est extrait majoritairement. En effet, dans les spectres IR, la bande $\nu_{\text{C=O}}$ à 1691 cm^{-1} est plus intense que celle à 1716 cm^{-1} qui se résume en un épaulement. Cet épaulement est peu visible dans les extraits 1 et 2, mais augmente au fur et à mesure des extractions. De la même façon, la présence des esters à Rf ~ 0,9 n'apparaît qu'à partir de l'extrait 2. Les aires de la bande C=O ester à 1738 cm^{-1} augmentent

graduellement au cours des extractions. Notons qu'au cours de l'immersion N°3, peu de composés ont été extraits : le densitogramme 3 présente une intensité assez faible.

En conclusion, l'immersion des pommes entières dans le chloroforme extrait majoritairement les triterpénoïdes. L'acide oléanolique est majoritaire, comme cela a été précédemment identifié dans les cires totales des pommes de cette étude (Cf. § 3. 3. 2. 1. c-). Il faut noter qu'une autre série de molécules est extraite par le chloroforme à Rf compris entre 0,15 et 0,30. Les aires de ces composés augmentent au cours des extractions tandis que celle des triterpénoïdes diminuent. Nous n'avons pas procédé à l'identification de ces molécules. Enfin, les esters ne sont pas extraits préférentiellement par le chloroforme.

Les triterpénoïdes ont été quantifiés par CCMHP/UV-Visible (Tableau II-13). Ces extraits se présentent sous la forme de cristaux de couleur crème. Les composés cycliques tels que les triterpènes entre autres se concentrent presque exclusivement dans les cires intracuticulaires (Buschhaus et Jetter 2011 [9]). Les acides triterpéniques ne sont pas solubles dans l'hexane mais leur solubilité est très élevée dans le chloroforme. Les triterpénoïdes identifiés dans les cires représentent en moyenne plus de 30 % massique de l'extrait dans le chloroforme. Cela représente plus de 94 % de la totalité des triterpénoïdes extraits par immersion (hexane+chloroforme) des pommes entières. L'hexane en extrait entre 3 % (VAR1 et VAR2) et 6 % (VAR3) seulement.

Variété	VAR1	VAR2	VAR3
Aspect des extraits secs CHCl ₃	Cristaux blancs à jaunâtres		
Teneur moyenne en triterpénoïdes totaux (% massique d'extrait CHCl ₃)	32,0 ± 2,1	34,2 ± 2,9	31,2 ± 1,4
% acides triterpénique	27,42 ± 1,64	29,23 ± 2,03	26,49 ± 1,05
% uvaol	4,61 ± 0,49	5,01 ± 0,89	4,74 ± 0,36

Tableau II-13 : Teneurs moyennes en triterpénoïdes des extraits de cires dans le chloroforme (Variétés 1, 2 et 3)

d- Caractérisation chimique des extraits dans le méthanol des cires de pommes

La présence de sucres libres et de phloridzine, un polyphénol identifié dans la pomme, a été évaluée dans les extraits de cires dans le méthanol ont été par CCMHP/UV visible et par IRTF (Figure II-29).

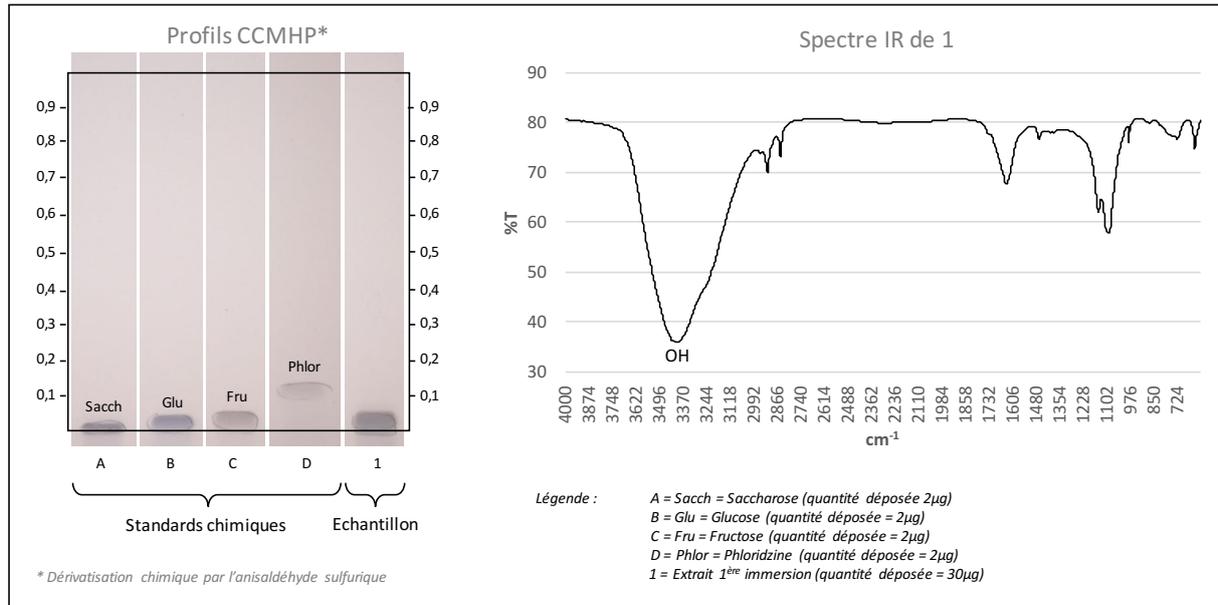


Figure II-29 : Caractérisation chimique des extraits de cires dans le méthanol par CCMHP/UV-Visible et par IRTF (Variété 2)

Le suivi analytique par CCMHP et par IRTF de la première immersion (track 1) des fruits entiers dans le méthanol montre que l'extrait ne présente pas une grande complexité chimique, comparativement aux extraits dans les autres solvants. Plusieurs composés sont présents proches de la ligne de dépôt en CCMHP. Sur le spectre IR, quatre bandes principales sont relevées : ν_{OH} à 3410 cm^{-1} et trois autres bandes à 1642 cm^{-1} et $\nu_{\text{C-O-C}}$ à 1145 cm^{-1} et 1092 cm^{-1} . La bande à 1642 cm^{-1} est accompagnée d'un épaulement vers 1725 cm^{-1} . Il semble qu'il soit composé d'oses essentiellement. De plus, leur coloration marquée indique qu'ils contiennent des molécules colorées telles que les anthocyanes, également détectées parmi les polyphénols des pommes (Cf. § I- 1. 5. 2. et Tableau I-8).

Les glucides libres (saccharose, glucose et fructose) et la teneur en anthocyanes totales ont été quantifiés par CIHP et spectrophotométrie UV-Visible respectivement (Tableau II-14). Ces extraits se présentent sous la forme d'un solide très collant, hygroscopique et fortement coloré. Ils sont caractérisés presque exclusivement par des sucres libres dont la quantité oscille entre 40 (VAR1 et VAR3) et 95 % de la masse d'extrait dans le cas des pommes Fuji (VAR2). Comme attendu, la teneur en anthocyanes totales est beaucoup plus élevée dans les extraits provenant des pommes dont la coloration rouge ou rose est prépondérante (VAR1 et VAR3). L'épiderme de la Fuji tend vers le jaune-verdâtre avec quelques zones de couleur rose-orangé.

Variété	VAR1	VAR2	VAR3
Aspect des extraits secs MeOH			
Teneur moyenne en glucides totaux (% massique d'extrait MeOH)	44,2	94,5	41,3
% Sorbitol	1,23	3,02	1,27
% Glucose	9,96	30,41	8,76
% Saccharose	6,29	10,96	8,56
% Fructose	26,73	50,11	22,72
Teneur moyenne en anthocyanes (mg éq. Cyanidine-3-O-galactoside / kg d'extrait partiel MeOH)	8	2	6

Tableau II-14 : Teneurs moyennes en glucides libres et en anthocyanes totales des extraits de cires dans le méthanol (Variétés 1, 2 et 3)

e- Bilan comparatif entre cires totales et extraits de cires

Nous avons comparé dans le Tableau II-15 les rendements en cires totales extraites par Soxhlet à partir des épidermes lysés de pommes et ceux des fractions obtenues par immersion des pommes entières successivement dans l'hexane, le chloroforme et le méthanol (voies de fractionnement 2 et 4 respectivement dans la Figure II-4). Les rendements sont exprimés en mg d'extrait sec par kg de fruits et en mg d'extrait sec par surface de l'épiderme en cm².

Les rendements des fractions méthanoliques sont très élevés et sont en moyenne entre 2 et 6 fois plus importants que ceux des cires totales. L'hypothèse a été émise que, lorsque la surface des épidermes a été fortement appauvri en cires extraites par l'hexane et le chloroforme, le méthanol accède à travers la cuticule décirée à des composés autres que des lipides solubles, tels que les glucides libres. Les anthocyanes sont également extraites et préservées par des conditions d'extraction douces, différentes de l'extraction par Soxhlet après lyse enzymatique des épidermes. En revanche, la nature des composés extraits par immersion dans l'hexane et le chloroforme confirme l'extraction des lipides cuticulaires solubles (alcanes, triterpénoïdes, esters). En effet, lorsque les fractions hexane et chloroforme sont réunies, les rendements d'extraction sont du même ordre de grandeur que ceux des cires totales.

Variété	Rendements (mg/kg fruits)				
	Cires totales	Fraction hexane	Fraction CHCl ₃	Fraction MeOH	Fractions hexane + CHCl ₃
1	955,9	393,5	702,3	4905,9	1095,8
2	984,4	274,7	751,7	2014,3	1026,4
3	1322,9	384,8	955,1	6477,8	1339,9
Variété	Rendements (mg/cm ²)				
	Cires totales	Fraction hexane	Fraction CHCl ₃	Fraction MeOH	Fractions hexane + CHCl ₃
1	0,931	0,368	0,657	4,588	1,025
2	0,870	0,295	0,807	2,163	1,102
3	1,277	0,394	0,979	6,640	1,373

Tableau II-15 : Bilan des rendements d'extraction des cires totales et des fractions extraites par immersion des pommes dans les solvants (variétés 1, 2 et 3)

Les bilans matières des cires totales et des fractions solvant sont présentés dans le Tableau II-16.

VAR	Extrait	% alcanes	% esters	% triterpénoïdes	% glucides libres	% total identifié	% non identifiés**
1	Cires totales	13,9	21,5*	29,4	0,17	65	35
	Fraction hexane	38,6	59,8	1,6	Nd	100	0
	Fraction CHCl ₃	Nd	Nd	32,0	Nd	32	68
	Fractions hexane+CHCl ₃	13,9	21,5	21,1	Nd	57	43
2	Cires totales	6,5	21,3*	40,5	0,09	68	32
	Fraction hexane	17,7	79,4	2,9	Nd	100	0
	Fraction CHCl ₃	Nd	Nd	34,2	Nd	34	66
	Fractions hexane+CHCl ₃	4,7	21,3	26,3	Nd	52	48
3	Cires totales	7,0	21,1*	43,3	0,12	72	28
	Fraction hexane	21,8	73,5	4,7	Nd	100	0
	Fraction CHCl ₃	Nd	Nd	31,2	Nd	31	69
	Fractions hexane+CHCl ₃	6,3	21,1	23,3	Nd	51	49

Tableau II-16 : Bilans matières des cires totales et des fractions solvants

Légende : Nd = non déterminés

*par extrapolation des teneurs dans les fractions hexane+CHCl₃

**alcools gras, acides gras, diols, β-dicétones...

La totalité des composés des fractions hexane a été identifiée sur la base de l'hypothèse que majoritairement les fractions étaient composées d'esters, d'alcanes et de triterpénoïdes. Dans ces extraits, les taux d'alcanes et d'esters sont très variables d'une variété à l'autre. Les teneurs en triterpénoïdes (exclusivement acide ursolique) sont faibles mais augmentent de la variété 1 à la variété 3, comme cela a déjà été observé pour les teneurs totales en triterpénoïdes dans les cires totales. Dans les fractions chloroforme, seuls les triterpénoïdes ont été identifiés. Ils ne représentent qu'environ 30% mais cette valeur est constante quelle que soit la variété de pommes extraite. Lorsque les deux fractions sont additionnées, environ la moitié des composés a été identifiée. Les taux en esters et en triterpénoïdes (acides + uvaol) sont alors stables autour de 21 % et 23 % quelle que soit la variété de pommes. Les taux d'alcanes sont un peu plus variables et sont du même ordre de grandeur que ceux évalués dans les cires totales. Par conséquent, il peut être conclu que la totalité des hydrocarbures aliphatiques a été solubilisée lors des immersions dans l'hexane. Concernant les cires totales, considérant que les rendements d'extraction des cires totales étaient identiques aux rendements d'extraction des fractions hexane + chloroforme, le taux d'esters évalué dans les deux fractions a été considéré comme identique dans les cires totales. Par conséquent, près de 70 % des composés des

cires totales ont été identifiés. Les 30 % non identifiés correspondent aux alcools gras, acides gras, diols et β -dicétones qui constituent les composés minoritaires.

La différence fondamentale entre ces différents extraits réside dans les taux de triterpénoïdes : ils sont nettement plus faibles dans les fractions hexane + chloroforme que dans les cires totales. Deux hypothèses peuvent être émises :

- il a été supposé que les acides et les esters des cires étaient en interaction (liaisons hydrogène). Il est possible qu'il en soit de même avec les esters du polymère de cutine, soit parce qu'une fois que les esters des cires ont été extraits à l'hexane, les acides ont formé des liaisons hydrogènes avec les esters de la cutine, soit parce que les deux catégories d'interactions existent dans la cuticule. Les conditions d'extraction par immersion dans le chloroforme ne seraient pas assez fortes pour rompre les liaisons et libérer tous les acides triterpéniques ;
- soit parce que le chloroforme ne permet pas d'extraire exhaustivement les acides triterpéniques malgré sa sélectivité vis-à-vis d'eux. Dans les travaux de Frighetto *et al.* 2008 [47], les cires épicuticulaires d'épidermes de pommes Fuji, Gala et Granny Smith sont éliminées après immersion de 2 minutes dans l'hexane. L'extrait est suivi analytiquement par CCM pour vérifier l'absence d'acide ursolique. Les pommes sont ensuite immergées pendant 15 heures dans 4 solvants différents : éthanol à 96 %, chloroforme, dichlorométhane ou acétate d'éthyle. Selon les variétés et les solvants utilisés, jusqu'à 2 g d'acide ursolique ont pu être extraits sur 20 pommes pour chaque variété. La conclusion de ces travaux est que le choix du solvant d'immersion doit répondre à un équilibre entre sélectivité et extraction exhaustive. L'éthanol permet une extraction quasi-exhaustive de l'acide ursolique tandis que l'acétate d'éthyle et les solvants chlorés sont plus sélectifs mais incapables d'extraire la totalité de l'acide ursolique présent dans les épidermes. Nous avons évalué la solubilité de l'acide oléanolique dans différents alcools : elle est très faible dans l'éthanol mais l'acide est totalement soluble dans le butanol, l'éthyl-2-hexanol et l'alcool benzylique. Les résultats de l'étude de Frighetto *et al.* sont inattendus compte tenu de la solubilité de l'acide oléanolique dans les alcools.

3. 3. 2. 6. Conclusion

Les cuticules de pommes obtenues par lyse enzymatique des épidermes sont composées d'environ 41 % de cires cuticulaires, 46,5 % de cutine, 6 % de cutane et 6 % de polysaccharides pariétaux résiduels. Les cires cuticulaires se répartissent à la surface de la cuticule (cires épicuticulaires) et à l'intérieur du polymère de cutine (cires intracuticulaires). Les cires épicuticulaires peuvent être extraites sélectivement par cryo-adhésion dans le glycérol. Toutefois, la technique est délicate à mettre en œuvre dans le cas des pommes, aléatoire et laborieuse. L'immersion rapide (2 minutes) des pommes entières dans l'hexane produit un extrait proche de celui obtenu par cryo-adhésion. Dans cette étude, les cires épicuticulaires n'ont finalement pas été séparées des cires intracuticulaires pour être caractérisées. En revanche, l'étude de fractions de cires obtenues par immersions courtes (15 à 30 minutes), répétées (3 à 5 immersions cumulées) et successives (trois solvants : hexane, chloroforme et méthanol) a permis de fractionner les composés chimiques des cires cuticulaires en fonction de leur solubilité dans les différents solvants et de les identifier. Dans les extraits à l'hexane, des hydrocarbures aliphatiques (C27 et C29 majoritaires à 95 %), des esters et de l'acide ursolique ont été détectés. Les esters sont les composés majoritaires à plus de 60 %. Dans les extraits au chloroforme,

seuls les composés triterpéniques (acides oléanolique majoritaire, acide ursolique et uvaol) ont été identifiés et ne représentent en moyenne que 30 % pour les trois variétés de pommes. Les extraits méthanoliques, très colorés par la présence d'anthocyanes préservées par les conditions douces d'extraction, sont très riches en glucides libres (fructose, glucose et saccharose) : 44 % pour VAR1, 94 % pour VAR2 et 42 % pour VAR3. Les analyses par CCMHP/UV-Visible et IRTF n'ont pas révélé la présence d'autres molécules ou d'autres fonctions chimiques. Il a été conclu que les extraits méthanoliques ne sont pas représentatifs des cires cuticulaires. Il s'est avéré que les rendements en cires totales, extraites dans un mélange chloroforme/méthanol (1 :1, V/V) par Soxhlet à partir des épidermes lysés, et les rendements des extraits hexane + chloroforme à partir de l'immersion de pommes entières sont similaires : les deux méthodes d'extraction conduiraient donc à des extraits totaux similaires.

Dans les cires cuticulaires totales, il a été identifié entre 5 et 14 % d'hydrocarbures aliphatiques (C27 et C29 majoritaires à 95 %), 21 % d'esters, 29 à 43 % de triterpénoïdes (acides oléanolique - majoritaire à 65 % - et ursolique et uvaol) ainsi que de très faibles quantités de glucides libres (entre 0,09 et 0,17 %). La nature des esters n'a pas été élucidée, ainsi que celle des composés non identifiés qui représentent environ 30 % des cires totales. Il a été relevé que la teneur en triterpénoïdes dans les extraits totaux était supérieure à celle des fractions hexane + chloroforme. L'IRTF a mis en évidence qu'il existait une interaction forte entre les esters des cires et/ou de la cutine et les acides triterpéniques (liaisons hydrogènes). Il est probable que cela limite l'extraction de ces derniers dans les conditions douces des immersions solvants.

Les cires des épidermes de pommes Gala (VAR1) sont constituées de 14 % d'alcane, 21 % d'esters et 29 % de triterpénoïdes. Cette composition confère à la surface des propriétés hydrophobes (angle de goutte moyen de 104,5° à 25°C). Les cires des épidermes de Fuji (VAR2) sont constituées de 5 % d'alcane, 21 % d'esters et 41 % de triterpénoïdes. Cette composition confère à la surface des propriétés encore hydrophobes mais ce caractère est plus faible que dans le cas des pommes Gala (angle de goutte moyen de 94,4° à 25°C). Les cires des épidermes de pommes Pink Lady® (VAR3) sont constituées de 7 % d'alcane, 21 % d'esters et 43 % de triterpénoïdes. Cette composition confère à la surface des propriétés hydrophiles (angle de goutte moyen de 80,8° à 25°C). Plus les cires sont riches en acides triterpéniques (angle de goutte de 89,5° pour l'acide ursolique), plus la surface devient mouillable (l'angle de goutte diminue). Les alcanes et les esters sont moins polaires et les angles de gouttes sont plus élevés autour de 105°5 - 108°5 et 104°1 - 105°5 respectivement. La Gala dont les cires contiennent le plus d'alcane et d'esters (35 %) possède la surface la plus hydrophobe et la moins mouillable. Toutefois, la disposition des cristaux de cires intervient dans la mouillabilité. Plus les cires seront disposées à la verticale de la surface de l'épiderme, plus l'angle de goutte sera élevé. Les épidermes de Gala observés au cryo-MEB ont mis en évidence une surface hérissée de très nombreuses plaquettes de cires disposées verticalement. La particularité de cette disposition est que les plaquettes peuvent être facilement arrachées lors d'une abrasion de la surface qui devient alors beaucoup plus mouillable. Les épidermes de la Pink Lady® sont caractérisés par une surface plutôt lisse avec peu de relief de cires : ce sont des surfaces plutôt mouillables. Quant à l'épiderme de la Fuji, il s'agit d'un intermédiaire entre celui de la Gala et celui de la Pink. La surface est recouverte d'un film granuleux mais assez inégal. De nombreuses plaquettes de cires disposés plutôt horizontalement se décollent du film et des tubules sont observés à divers endroits. C'est une surface faiblement mouillable.

3. 4. Caractérisation structurale des lipides cuticulaires

L'objectif de la caractérisation structurale est de proposer un schéma de l'organisation tridimensionnelle des différents lipides qui composent la cuticule. Quelle est la proportion de zones amorphes et cristallines et comment se répartissent-elles dans la cuticule ? Y-a-t-il un effet variété ? Les réponses permettront de définir le chemin de diffusion apolaire qui régit le transport de tous les solutés non ioniques y compris l'eau à travers la cuticule (Cf. § I- 2. 5. 2.). Pour cela, les différentes composantes de la cuticule (cuticule entière, cires totales et cuticules décirées) des épidermes des trois variétés de pommes ont été analysées par diffraction des rayons X, analyses thermique différentielle à balayage, RMN du ^{13}C solide et par MEB.

3. 4. 1. Caractérisation par analyse de diffraction des RX

Les cuticules entières préparées par lyse enzymatique, les cuticules décirées et les cires totales extraites par Soxhlet ont été analysées par diffraction des rayons X afin de déterminer les différentes structures cristallines et amorphes qui les caractérisent (Figure II-30). Les diffractogrammes des différentes fractions de la cuticule des pommes mettent en évidence deux profils de pics : des pics lorentziens spécifiques des structures cristallines et des pics gaussiens spécifiques des structures amorphes. Quelle que soit la variété, les cuticules décirées, presque exclusivement constituées par la cutine, présentent une structure totalement amorphe tandis que les cires sont caractérisées par un mélange de structures amorphes et cristallines. Par conséquent, les petites structures cristallines observées dans les diffractogrammes des cuticules entières sont attribuées uniquement à la présence des cires cuticulaires dans la cutine.

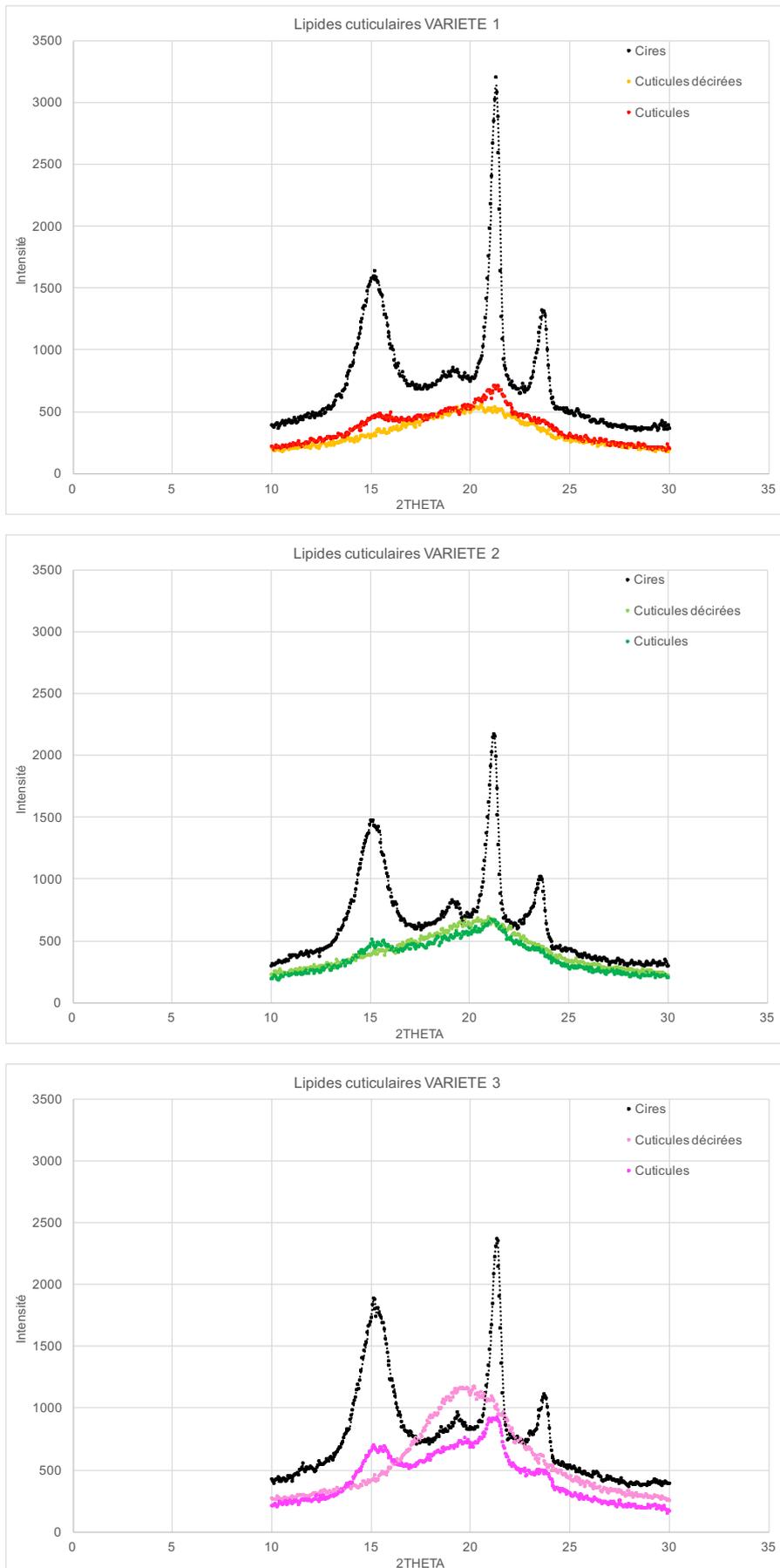


Figure II-30 : Diffractogrammes RX des lipides cuticulaires des épidermes de pommes (Variétés 1, 2 et 3)

En évaluant les aires des différents pics, il est possible d'évaluer les taux relatifs des différentes structures amorphes et cristallines (Tableau II-17).

Lipides cuticulaires	Variété	% amorphe	% cristallin	Composition massique (%)	% amorphe*	% cristallin*
Cuticules entières	1	79,3	20,7	100	81,4	18,6
Cuticules décirées (cutine-cutane)		100,0	0,0	61,1	100,0	0,0
Cires totales		52,3	47,7	38,9	52,3	47,7
Cuticules entières	2	78,4	21,6	100	78,3	21,7
Cuticules décirées (cutine-cutane)		100,0	0,0	57,3	100,0	0,0
Cires totales		49,1	50,9	42,7	49,1	50,9
Cuticules entières	3	79,3	20,7	100	79,0	21,0
Cuticules décirées (cutine-cutane)		100,0	0,0	57,8	100,0	0,0
Cires totales		50,2	49,8	42,2	50,2	49,8

Tableau II-17 : Evaluation des ratios des structures amorphes et cristallines dans les lipides cuticulaires des épidermes de pommes (Variétés 1, 2 et 3).

Légende : * Taux de structures amorphes et cristallines calculés à partir de la composition massique des cuticules et des ratios amorphe/cristallin des cires et des cuticules décirées

Quelle que soit la variété de pommes, les cires cuticulaires contiennent en moyenne 50 % de structures amorphes et 50 % de structures cristallines. Les cuticules entières montrent qu'elles sont caractérisées par 80 % en moyenne de structures amorphes et 20 % de structures cristallines. La teneur en structures amorphes et cristallines des cuticules entières a également été calculée à partir de leur composition massique en cires et en cutine/cutane (cuticules décirées) et des ratios amorphe/cristallin correspondants, évalués sur les radiogrammes respectifs selon les équations (8) et (9).

$$(\% \text{ amorphe}^*)_{\text{cuticule entière}} = (\% \text{ cutine - cutane}) * (\% \text{ amorphe})_{\text{cutine-cutane}} + (\% \text{ cires}) * (\% \text{ amorphe})_{\text{cires}} \quad (8)$$

$$(\% \text{ cristallin}^*)_{\text{cuticule entière}} = (\% \text{ cutine - cutane}) * (\% \text{ cristallin})_{\text{cutine-cutane}} + (\% \text{ cires}) * (\% \text{ cristallin})_{\text{cires}} \quad (9)$$

Le calcul du ratio amorphe/cristallin des cuticules confirme les résultats analytiques (cellules surlignées en gris dans le Tableau II-17).

3. 4. 2. Caractérisation par analyse thermique DSC

Afin d'identifier les transitions vitreuses de second ordre (Tg) relatives à la présence de structures amorphes dans les cuticules de pommes, les différents lipides cuticulaires ont été soumis à des analyses par DSC. Les Tg sont assez difficiles à identifier car l'énergie mise en jeu est faible et seul le mode Topem, équivalant à une DSC modulaire avec une rampe thermique très faible (Cf. paramètres § 2. 7. 2. d-), a permis de les analyser. Elles ont pu être mesurées dans les thermogrammes représentant la chaleur réversible des cuticules décirées (cristallinité = 0 %) et entières (cristallinité = 20 %) (Figure II-31). Plus le taux de cristallinité augmente, plus les transitions vitreuses sont difficiles à observer. Dans le cas des cires (cristallinité = 50 %), aucune Tg n'a été détectée dans les conditions d'analyse. Les transitions de premier ordre généralement associées aux températures de fusion ont été relevées sur les thermogrammes représentant le flux de chaleur totale.

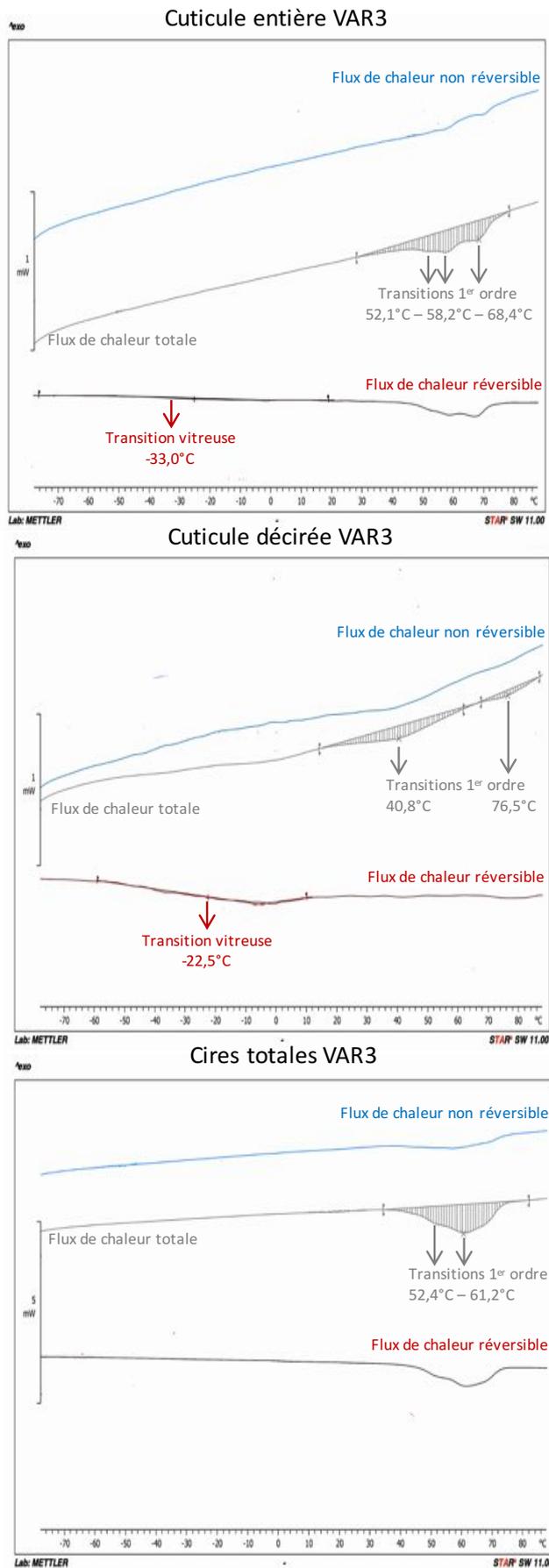


Figure II-31 : Thermogrammes DSC TOPEM des différentes composantes de la cuticule (Variété 3)

Les différentes températures relevées pour les différentes composantes (cuticules entières, cuticules décirées et cires totales) des épidermes des trois variétés de pommes sont présentées dans le Tableau II-18.

Variété	Echantillon	Transitions thermodynamiques (°C)							
		2 nd ordre		1 ^{er} ordre					
		Tg1	Tg2	T1	T2	T3	T4	T5	T6
1	Cuticules	- 38,1	nd	-	53,7	58,9	-	-	-
	Cuticules décirées	- 25,2	nd	-	53,8	-	62,8	70,1	-
	Cires	nd	nd	-	50,5	59,1	-	-	-
2	Cuticules	- 35,9	nd	-	-	57,2	65,9	-	-
	Cuticules décirées	- 26,0	52,2	-	-	-	-	-	-
	Cires	nd	nd	-	-	55,7	61,4	-	-
3	Cuticules	- 33,0	nd	-	52,1	58,2	-	68,4	-
	Cuticules décirées	- 22,5	nd	40,8	-	-	-	-	76,5
	Cires	nd	nd	-	52,4	61,2	-	-	-

Tableau II-18 : Transitions thermodynamiques mesurées par DSC TOPEM des lipides cuticulaires des épidermes de pommes (Variétés 1, 2 et 3).

Légende : Tg = température de transition vitreuse,
T = température de fusion, liquéfaction ou ramollissement,
nd = non détecté

Quelle que soit la variété, la température de transition vitreuse des cuticules entières se situe en moyenne autour de - 25°C (Tableau II-18, Tg1). Luque et Heredia ont mesuré une Tg de l'ordre de - 30°C dans les cuticules de tomates (Luque et Heredia 1994 [48]). Ils ont associé cette transition vitreuse à un changement de conformation des chaînes principales de la molécule de cutine et en particulier des longues chaînes méthyléniques qui sont empilées de manière dense. Quelle que soit la variété, la présence des cires dans les cuticules entraîne une diminution de la Tg1 de la cutine de - 25°C à - 35°C en moyenne. Dans ce cas, les cires agissent comme plastifiants de la cutine. Dans le cas de la variété 2, il est à noter une seconde transition vers 50°C. Elle n'a pas été détectée dans les deux autres variétés. Chen *et al.* en 2008 [23] ont mesuré une température de transition vitreuse dans les cuticules décirées de *Malus domestica* de - 42°C qui descend à - 44°C dans les cuticules entières : de la même manière ici, les cires ont un effet plastifiant sur la cutine. Une seconde transition vitreuse a été relevée dans ces dernières à 12,8°C. La transition vitreuse des cires totales extraites s'élève à 45°C. La cuticule entière analysée par Chen *et al.* [23] est composée de 44,7 % de cires + 34,6 % de cutine + 7,5 % de cutane et 13,2 % de polysaccharides résiduels. La présence de 13,2 % de polysaccharides entraîne une diminution de la Tg de la cutine de - 25 à - 44°C (effet plastifiant des polysaccharides). Pour les trois variétés de pommes étudiées, l'analyse des cuticules entières à des taux moyens de l'ordre de 40 % de cires + 45 % de cutine + 7-8 % de cutane et 5-7 % de polysaccharides résiduels (Cf. Figure II-10, § 3. 2.). Les Tg relevées pour ces cuticules sont de l'ordre de - 35°C. Ces résultats sont cohérents avec ceux prévisibles à partir de l'étude de Chen *et al.* [23] :

$$0 \% < \underline{\% \text{ polysaccharides}} = 5-7 \% < 13,2 \% , - 44^{\circ}\text{C} < \underline{\text{Tg}} = - 35^{\circ}\text{C} < - 25^{\circ}\text{C}$$

La cuticule décirée analysée par Chen *et al.* [23] est composée de 62,6 % de cutine + 13,6 % de cutane + 23,9 % de polysaccharides résiduels. La Tg baisse de - 30 à - 42°C lorsque le taux de polysaccharides augmente de 0 à 23,9 %. Dans le cas des trois variétés de pommes, les cuticules décirées renferment 80 % de cutine, 8-12 % de cutane et 12-8 % de polysaccharides (Figure II-10, § 3. 2.). Les Tg mesurées dans ces échantillons sont un peu plus élevées que celles prévisibles à partir de l'étude de Chen *et al.* [23] :

$$0 \% < \% \text{ polysaccharides} = 8\text{-}12 \% < 23,9 \%, - 42^{\circ}\text{C} < - 30^{\circ}\text{C} < T_g = - 25^{\circ}\text{C}$$

Quels que soient les échantillons, les polysaccharides agissent comme plastifiant de la cutine. Lorsque les cuticules sont désuées, les cires deviennent anti-plastifiants de la cutine en augmentant la T_g de - 30 à - 25°C (Chen *et al.* 2008 [23]).

Tous les thermogrammes relatifs à la chaleur totale, hormis celui des cuticules décirées de la variété 2, présentent un pic endothermique plus ou moins large sur lequel se distinguent plusieurs sommets correspondant à différentes températures comprises entre 40 et 76°C. Reynhardt et Riederer ont proposé un diagramme de phase des cires en fonction de la température : lorsque la température augmente, les solides amorphes fusionnent puis les cristaux se transforment en solides amorphes qui fusionnent à leur tour (Reynhardt et Riederer 1994 [17]). Ces deux fusions contribuent au pic endothermique relevé dans les thermogrammes des cires (Tableau II-18, T2 et T3). Pour ce qui est de la cuticule, Luque et Heredia propose une autre interprétation. Ils ont observé ce même pic, entre 30 et 70°C, dans les cuticules de tomates. Ils ont attribué cet événement thermique à une transition de second ordre du polymère qui s'ajoute à l'impact de la présence des cires sur l'ensemble de la matrice. Cette transition qui apparaît dès 30°C correspondrait probablement à des changements de conformation mineurs, qui n'impliqueraient pas de mouvement au niveau des chaînes principales. Puis vers 45°C, la fusion des cires cristallines se superposent.

Dans le cas des cuticules décirées totalement amorphes, les températures T1 et T4-T6 pourraient être attribuées à des températures de fluidification ou de ramollissement du biopolymère, qui pourraient entraîner les changements de conformation mineurs évoqués par Luque et Heredia. Dans le cas des cuticules entières caractérisées par 20 % de structures cristallines, les deux natures de transition endothermique coexistent : fusion des cires (Tableau II-18, T2 et T3,) et fluidification/ramollissement du polymère (Tableau II-18, T1, T4-T6).

3. 4. 3. Caractérisation par RMN ^{13}C du solide

Les cuticules entières, décirées et les cires des trois variétés de pommes ont été analysées par RMN ^{13}C du solide selon trois techniques. L'expérience CP-MAS permet de voir les carbones qui présentent un couplage dipolaire avec les hydrogènes. Plus le groupement CH est mobile, plus le couplage dipolaire diminue, s'exprimant par une diminution de l'intensité du signal. Si la mobilité est forte, le signal peut disparaître comme dans le cas des liquides. Les noyaux très mobiles (*i.e.* les liquides amorphes) peuvent être mis en évidence par des expériences INEPT-MAS. L'analyse par DP-MAS conduit à un spectre qui correspond à la somme des signaux obtenus par les expériences CP-MAS et INEPT-MAS ainsi que ceux des espèces qui ont une mobilité intermédiaire entre celle des parties rigides ou très mobiles. Le spectre de RMN ^{13}C DP-MAS représente donc l'ensemble des signaux des atomes de carbone de l'échantillon et permet leur quantification.

Diverses fonctions chimiques ont été identifiées avec une prédominance de CH_2 polyméthyléniques entre 0 et 50 ppm, typiques de la cutine notamment dans les spectres des cuticules (Cf. § 3. 3. 1.). Les atomes de carbone des groupements CH_2 des chaînes alkyles des composés aliphatiques se distinguent par un arrangement soit ordonné (configuration trans) soit désordonné (configuration gauche) des chaînes dans l'espace, se traduisant en RMN ^{13}C du solide par une modification des déplacements chimiques. Les déplacements à 29 ppm correspondent à des chaînes alcanes désordonnées (mélange de chaînes polyméthyléniques gauche et anti) comme par exemple dans les liquides amorphes tandis

que ceux à 32 ppm sont relatifs à des chaînes alcanes avec une structure linéaire polyméthylénique entièrement trans (Deshmukh *et al.* 2003 [49]).

Les spectres ^{13}C INEPT-MAS des cuticules décirées et entières (Figure II-32, B et C) présentent un signal à 29 ppm très intense tandis que le signal à 32 ppm est très faible voire inexistant : nous pouvons en conclure que les cuticules contiennent donc des structures très mobiles amorphes se trouvant exclusivement dans la cutine.

Les deux signaux à 29 et 32 ppm sont présents dans les spectres ^{13}C CP-MAS des trois échantillons (Figure II-32, A, B et C) : ils contiennent des structures rigides cristallines et amorphes solides. Dans le cas des cires (Figure II-32, A) et des cuticules entières (Figure II-32, C), le signal à 32 ppm est plus intense que celui à 29 ppm : les structures rigides cristallines sont majoritaires. Dans le cas des cuticules décirées (Figure II-32, B), le signal à 29 ppm est plus intense que celui à 32 ppm : elles sont plutôt caractérisées par des structures amorphes solides. Les cires ne contiennent pas de parties très mobiles mais elles présentent des zones avec une mobilité intermédiaire.

Dans de nombreux travaux (Shechter *et al.* 2006 [14], Chen *et al.* 2005 [50], Heredia 2003 [51]...), le rapport des intensités des deux signaux 32/29 mesurés sur les spectres de CP-MAS uniquement est utilisé comme indicateur du ratio structures rigides/amorphes mobiles. Les structures amorphes désordonnées sont ici exclusivement réduites à des structures mobiles. L'analyse pourrait gagner en précision si la CP-MAS était corrélée à la DP-MAS. Le ratio 32/29 permet d'évaluer le ratio correspondant à des chaînes alcanes linéaires/désordonnées dans l'expérience DP-MAS. La comparaison du ratio 32/29 entre l'expérience CP et DP-MAS permettrait d'évaluer qualitativement la proportion de partie mobile : s'il diminue notablement entre l'expérience CP et DP, cela signifie qu'une partie notable du signal à 29 ppm correspond à des espèces relativement mobiles (*i.e.* le signal à 29 ppm dans l'expérience CP est moins intense à cause de la mobilité).

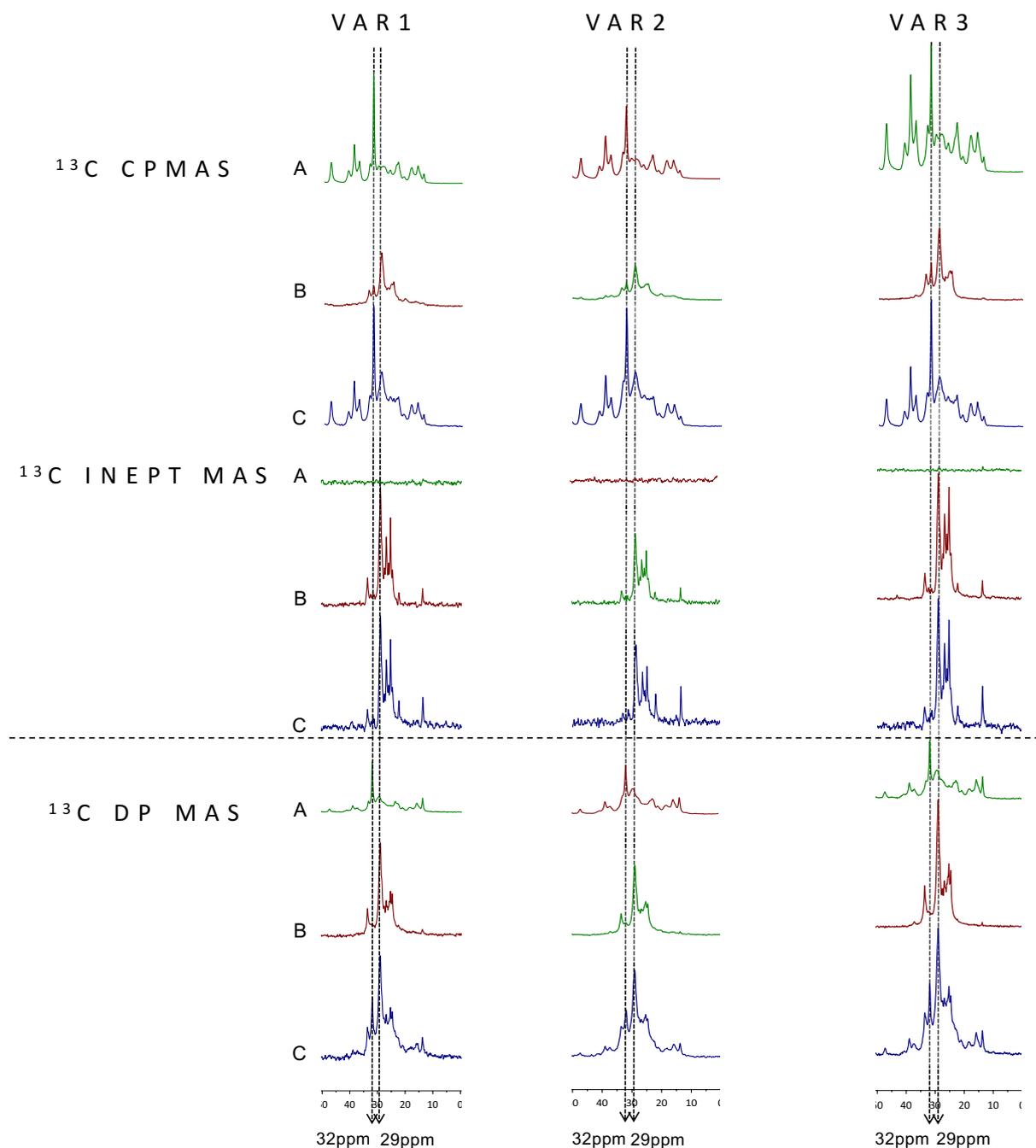


Figure II-32 : Analyses par RMN du ^{13}C du solide des cires (A), des cuticules décolorées (B) et des cuticules entières (C) des épidermes de pommes (Variétés 1, 2 et 3)

En conclusion, les cires présentent des structures cristallines et amorphes solides. Aucune structure très mobile n'a été identifiée, néanmoins il existe des structures de mobilité intermédiaire. Les cuticules décolorées se caractérisent par des structures amorphes solides et très mobiles. Il a été identifié des structures cristallines et amorphes solides (structures cristallines > structures amorphes mobiles) ainsi que des structures très mobiles dans les cuticules entières.

3. 4. 4. *Caractérisation par MEB*

Les faces externes et internes des cuticules isolées enzymatiquement à partir des peaux des pommes selon la voie 2 de fractionnement (Figure II-4) ont été observées par microscopie électronique à balayage (Figure II-33). La cuticule est facilement identifiable et notamment sur la face interne, l'emplacement des cellules épidermiques éliminées par la lyse se distingue explicitement.

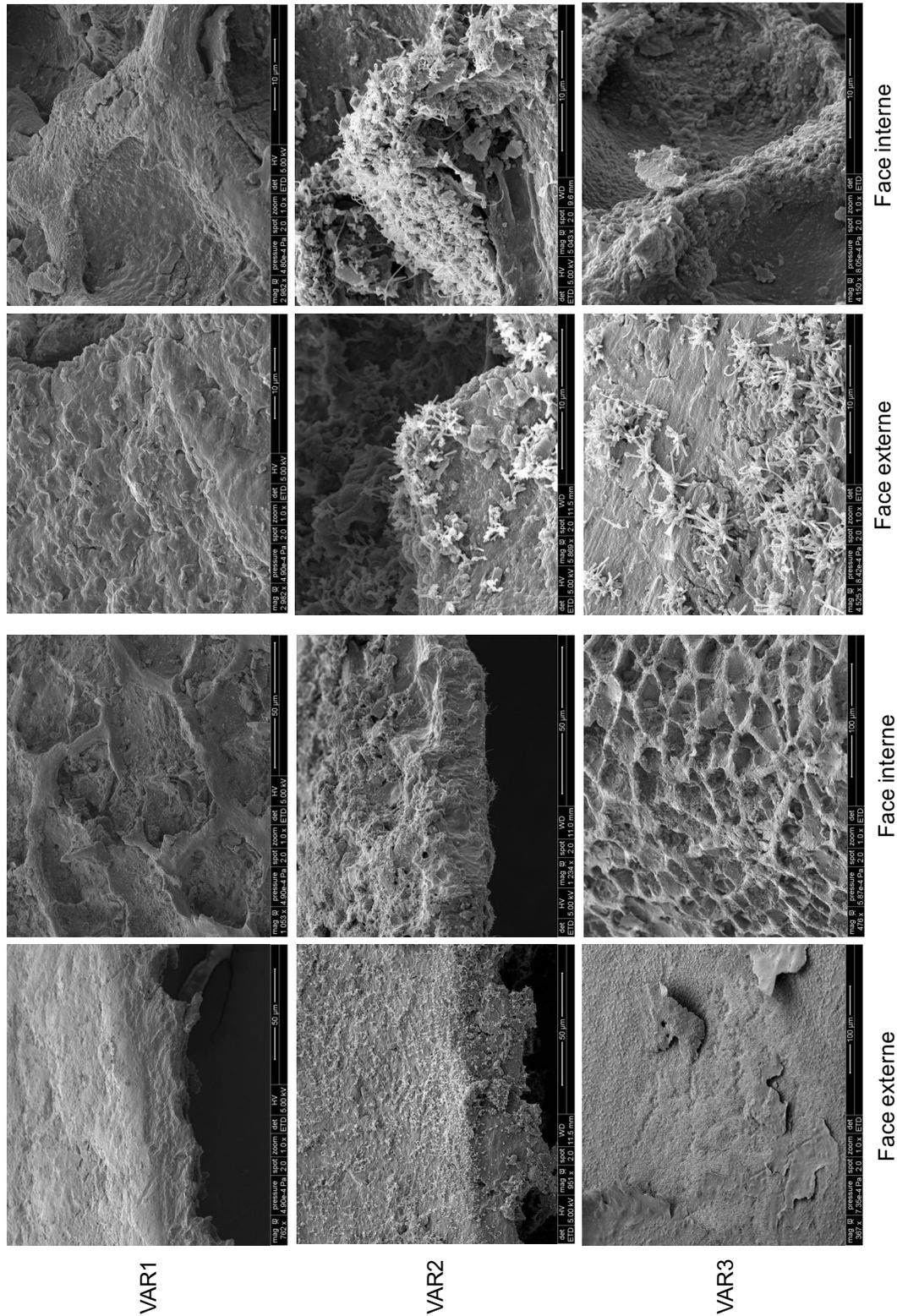


Figure II-33 : Micrographes des cuticules isolées des épidermes de pommes (Variétés 1, 2 et 3)

Des cristaux de cires de différentes formes recouvrent les deux faces des cuticules isolées (Figure II-34, terminologie selon Barthlott *et al.* 1998 [8]) :

- des couches planes semblables à une croûte parfois fissurées (A) ponctuées de granules (D) pour l'épiderme des pommes Gala (variété 1),
- des couches planes et lisses, parfois fissurées (B), ponctuées de granules (D), de plaquettes (F), de tubules (F et G), de bâtonnets agrégés par le centre (E) et de quelques filaments (H) pour l'épiderme des pommes Fuji (variété 2),
- des couches planes et lisses, fissurées (C) et accompagnées de granules (D), de tubules (F et G), de bâtonnets agrégés par le centre (E) et de nombreux filaments (H) pour l'épiderme des pommes Pink Lady® (variété 3).

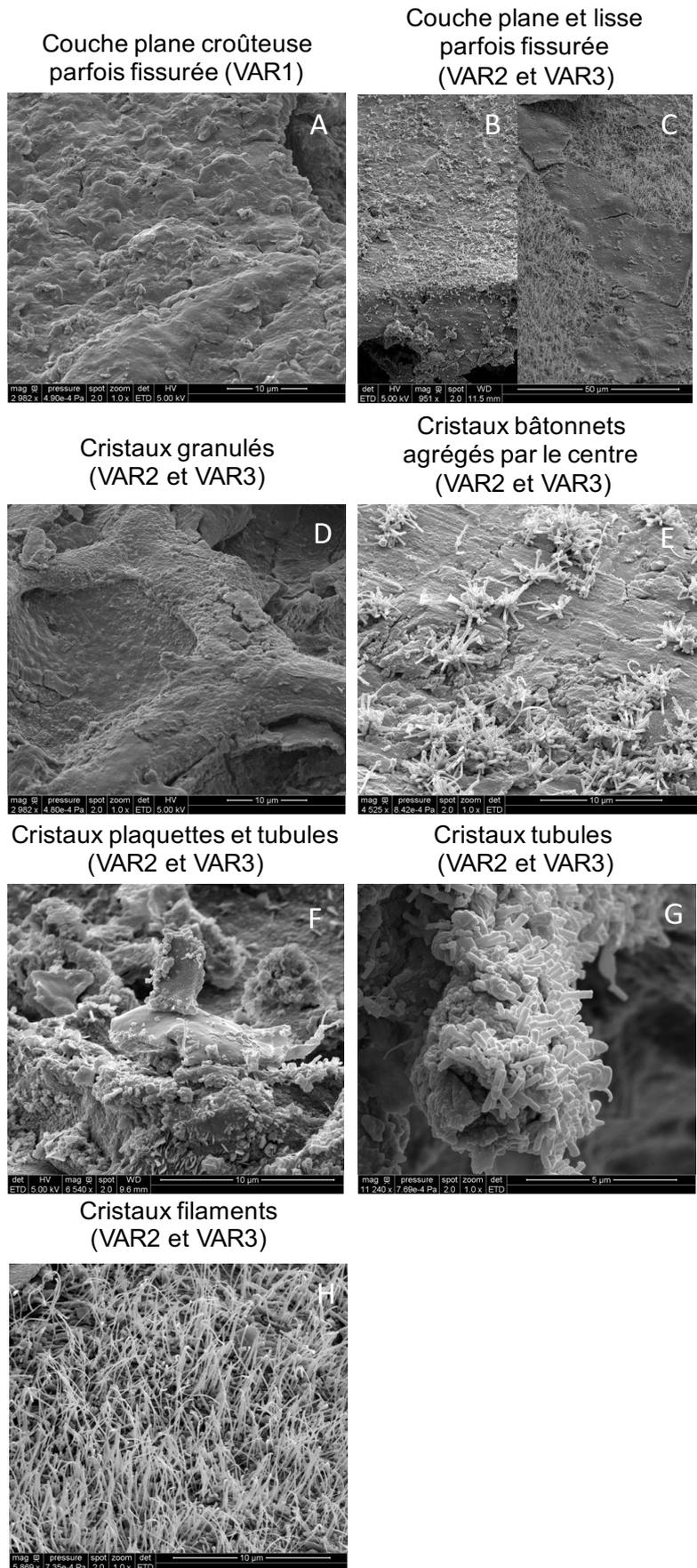


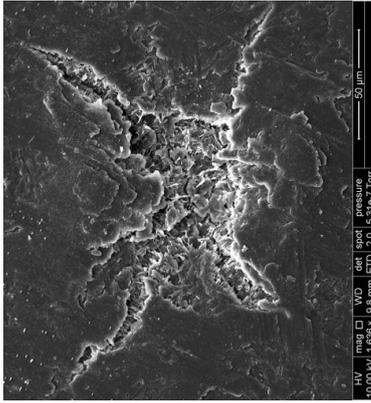
Figure II-34 : Micromorphologie des cires épicuticulaires des épidermes de pommes (Variétés 1, 2 et 3)

Les triterpénoïdes sont associés à différents cristaux : les plaquettes, certains bâtonnets et parfois les filaments. Les composés chimiques présents dans les cristaux sous forme de tubules sont de deux types : des alcools secondaires et des β -dicétones (Barthlott *et al.* 1998 [8]). Les variétés 2 et 3 plus riches en triterpénoïdes (> 40 %, Tableau II-7) présentent de très nombreux cristaux parmi lesquels beaucoup de bâtonnets, des plaquettes et des filaments (en grande quantité dans la variété 3). Les cristaux sous forme de tubules sont également présents en forte proportion dans les cires des pommes VAR2 et VAR3. Ils sont généralement mélangés avec les bâtonnets. Les cires de la variété 1 se distinguent nettement de celles des deux autres variétés. Peu de cristaux sont visibles. Les couches interne et externe se caractérisent par une croûte de cires à tendance granuleuse, en particulier la face interne.

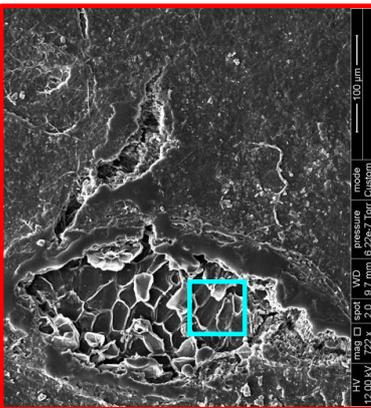
Existe-t-il une répartition homogène des cires à la surface de la cuticule ? Les rendements en cires sont généralement exprimés en mg/cm^2 (Tableau II-6). Toutefois, les cristaux de cires ne se répartissent pas uniformément sur les surfaces observées au MEB (Figure II-33 et Figure II-34). Il existe des zones où l'accumulation des cristaux sous forme de tubules, de bâtonnets et de filaments est beaucoup plus importante, notamment sur les reliefs des faces internes des cuticules. Les lenticelles (Figure II-35, a) et les craquelures (Figure II-35, b) qui surviennent sur la face externe de la cuticule sont également des zones denses de cristaux sous forme de plaquettes.

En conclusion, la densité des cires varie à la surface des cuticules. Les rendements en cires ne sont qu'une représentation de la répartition moyenne par rapport au calibre des fruits. Par conséquent, des zones aux propriétés physico-chimiques variables ponctuent la surface de la peau des pommes conférant une réactivité variable vis-à-vis notamment des interactions abiotiques comme les UV ou encore les intrants chimiques.

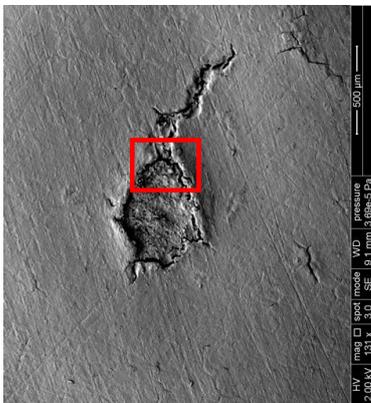
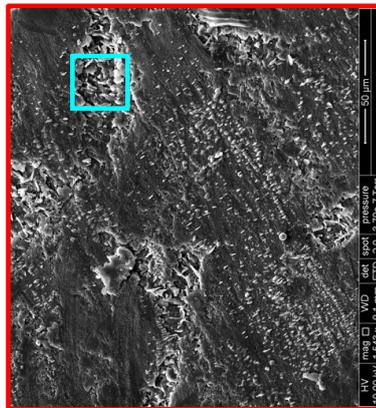
Epiderme frais VAR3



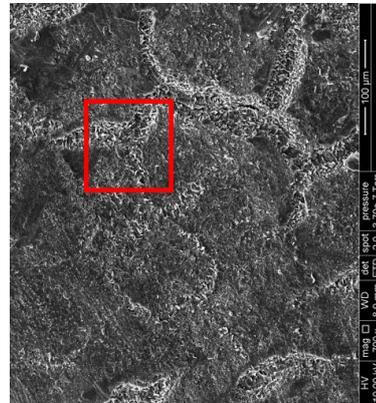
Epiderme frais VAR1



Epiderme frais VAR2



a



b

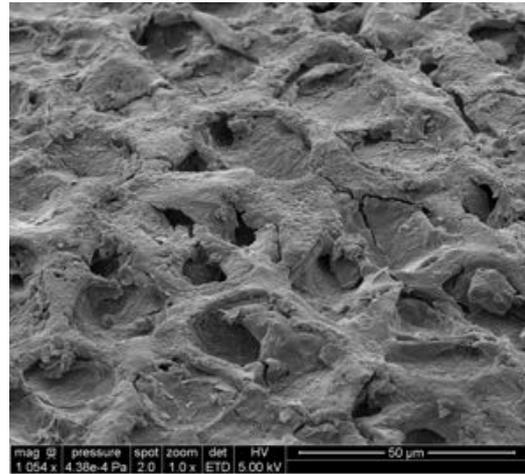
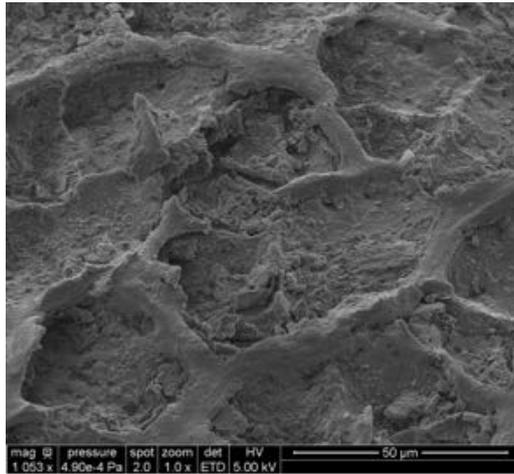
Figure II-35 : Micrographes des lenticelles (a) et des craquelures (b) et de leurs cristaux de cires (Variétés 1, 2 et 3)

De plus, l'analyse par MEB des surfaces interne et externe des cuticules isolées par voie enzymatique des peaux de pommes a montré que la densité des cires n'était pas uniforme. En particulier, la répartition des cristaux est beaucoup plus dense sur les reliefs (face interne, Figure II-36) et dans les dépressions (lenticelles et craquelures sur la face externe, Figure II-37).

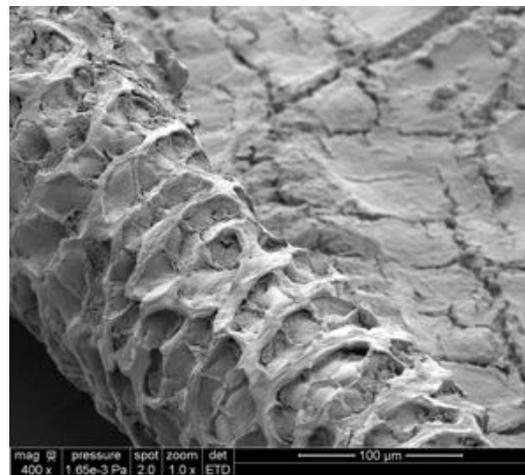
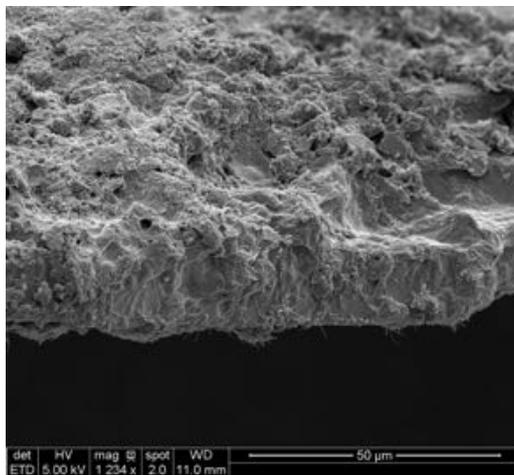
L'extraction des cires de la cuticule devrait faciliter l'observation de la cutine qui devient alors le composant principal à 80 % de la cuticule décirée. Cependant, l'ultrastructure reste assez complexe et difficile à caractériser. Dans la littérature, l'architecture moléculaire n'est toujours pas élucidée. Heredia *et al.* en 2000 [52] ont proposé une modélisation de la structure probable d'une section du polymère de cutine en tenant compte des caractéristiques moléculaires principales des divers polymères existant parmi les végétaux (Cf. § I- 2. 2. 1.). Les études de structure et de propriétés physico-chimiques concluent que la cutine est un polyester réticulé, amorphe et hydrophobe. Elle est aussi décrite comme un polymère vitreux présentant une capacité thermique élevée, une faible perméabilité aux gaz et à l'eau et un comportement viscoélastique à des températures physiologiques. Elle réunit toutes les caractéristiques d'un biopolymère (Thomas *et al.* 2013 [53]).

FACE INTERNE

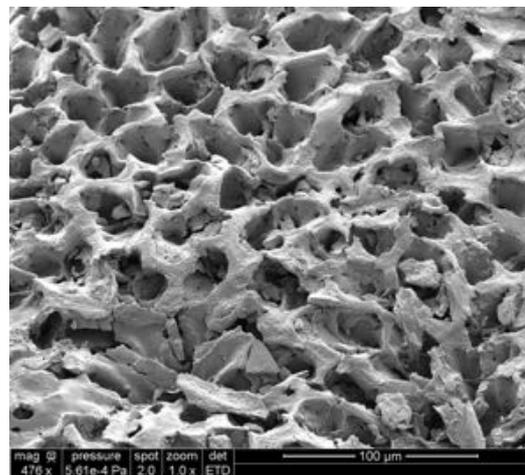
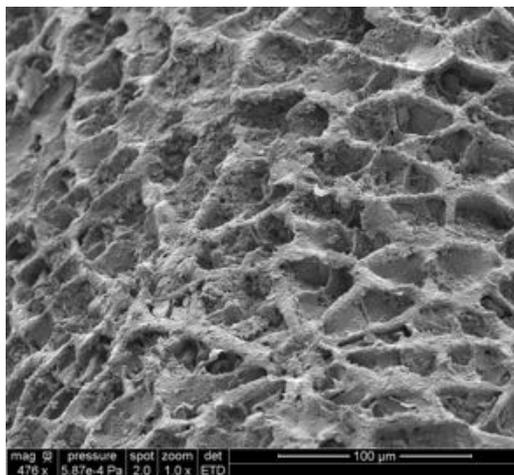
VAR1



VAR2



VAR3



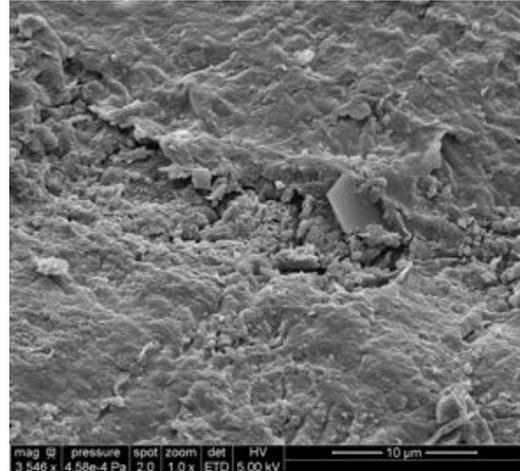
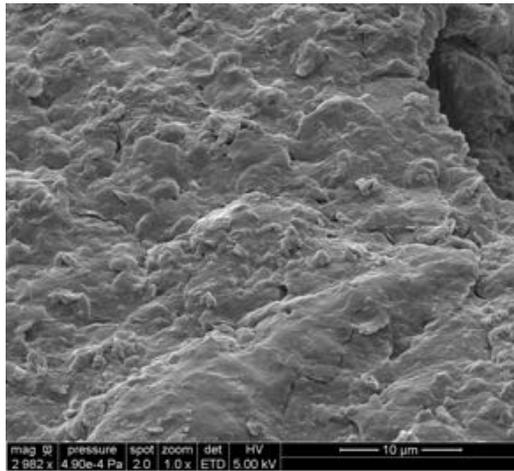
Avant déçirage

Après déçirage

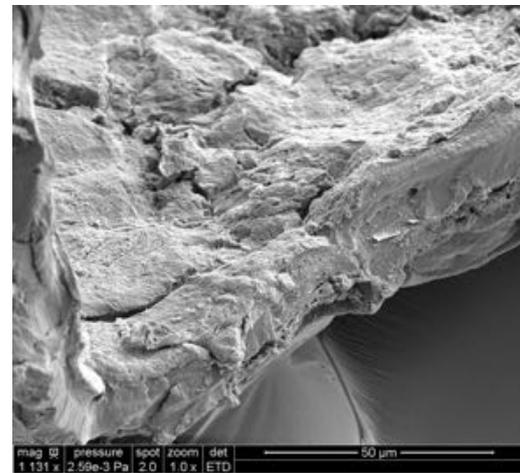
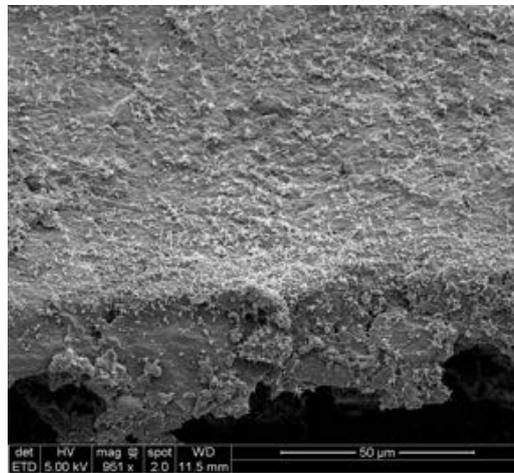
Figure II-36 : Micrographes des faces internes des cuticules avant et après déçirage (Variétés 1, 2 et 3)

FACE EXTERNE

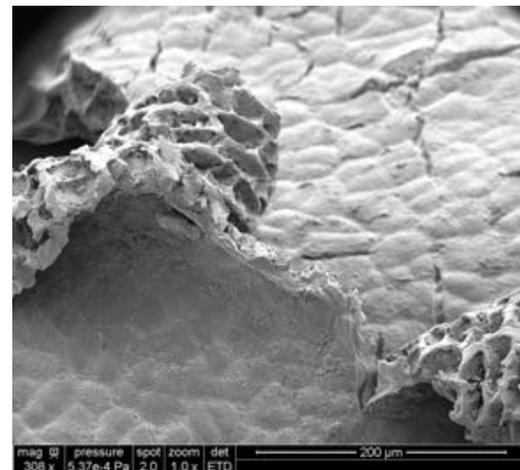
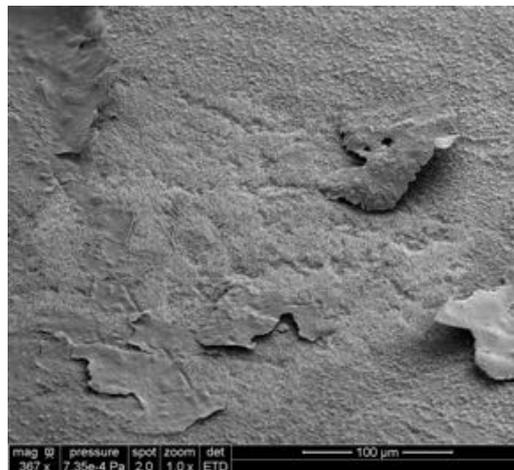
VAR1



VAR2



VAR3



Avant décirage

Après décirage

Figure II-37 : Micrographes des faces externes des cuticules avant et après décirage (Variétés 1, 2 et 3)

D'après l'interprétation des micrographes des cuticules entières et décirées des épidermes des trois variétés de pommes, il semblerait que les chaînes de polymère se structurent sous la forme de feuillets parallèles verticaux collés les uns aux autres, dans lesquels s'adcrustent les cristaux de cires (Figure

II-38). Aucune hypothèse n'a pu être émise quant à la disposition des cires intracuticulaires dans le polymère de cutine. Les cires épicuticulaires viennent recouvrir la matrice de cutine d'une couche horizontale plutôt amorphe sur laquelle se dressent les différents cristaux (Figure II-34).

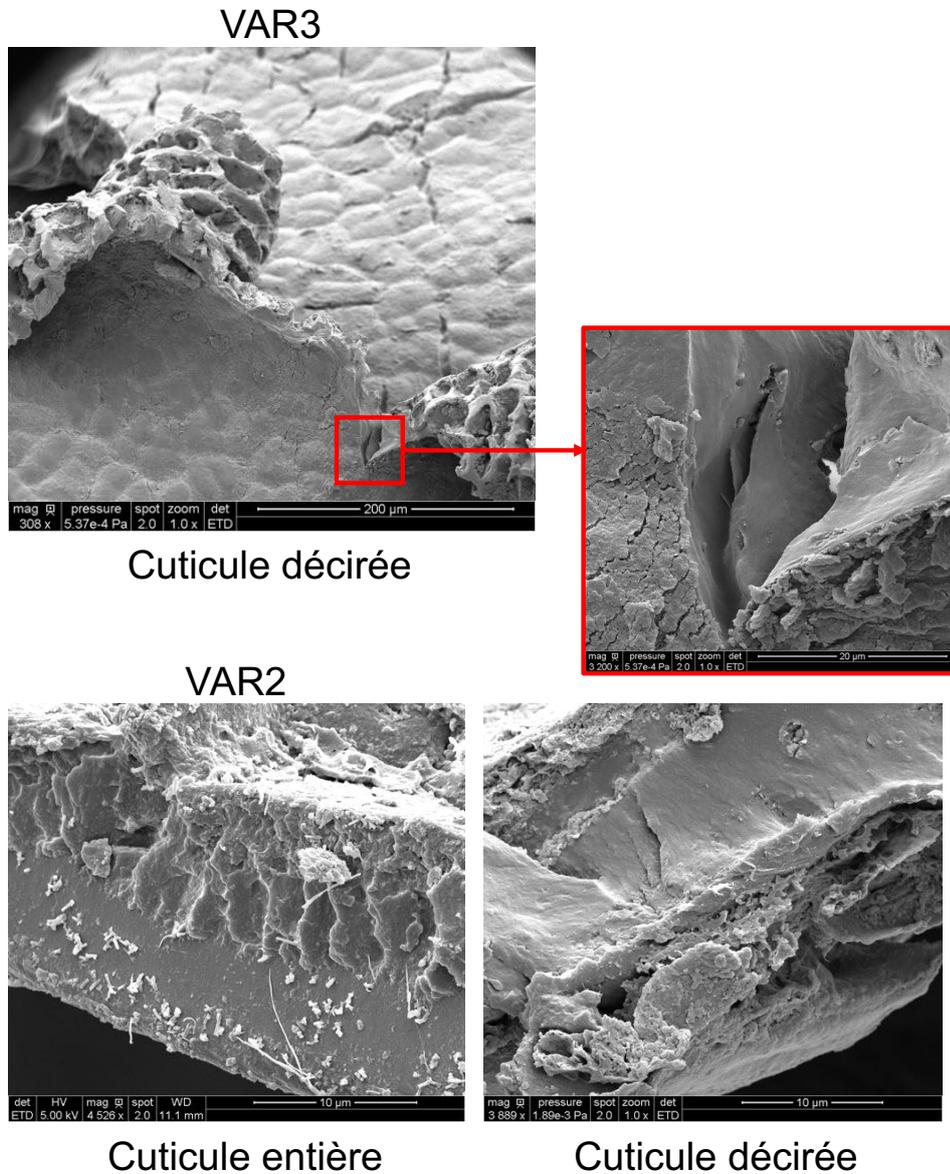


Figure II-38 : Micrographes des cuticules de pommes (Variétés 2 et 3)

En tant que couche la plus externe de la peau des fruits, la cuticule a la fonction d'une véritable barrière physico-chimique, empêchant notamment la déshydratation excessive des fruits (Holloway 1982 [54]) et la perte des solutés organiques et inorganiques, les protégeant des dommages mécaniques, des abrasions, de la pénétration des xénobiotiques (fertilisants, régulateurs de croissance, fongicides, insecticides et herbicides), des rayons UV et des infections par des agents pathogènes (Szakiel *et al.* 2012 [31]).

L'importante inhomogénéité de la répartition des cires sur toute la cuticule associée à la complexité des parties rigides (cristallines ou amorphes) et mobiles (liquides amorphes) entraînera une variabilité de la réactivité de la membrane vis-à-vis de la plupart des interactions et en particulier vis-à-vis de la

pénétration de molécules chimiques. Les cires agissant comme une barrière physico-chimique, il est logique que les zones les plus denses en cires seront moins perméables aux intrants phytosanitaires. La répartition de ces derniers ne sera pas uniforme ni à la surface du fruit, ni même dans l'épaisseur de la cuticule. La caractérisation physico-chimique et organisationnelle de la peau des pommes est fondamentale pour une meilleure compréhension des phénomènes de sorption/diffusion et de rétention/désorption des différentes molécules de phytosanitaires au sein même de la cuticule.

3. 5. Etude de la dynamique moléculaire du fludioxonil dans la cuticule des pommes (Fuji) par RMN ^{19}F du solide

3. 5. 1. Généralités

Cette étude ne peut pas ignorer la présence d'une dernière catégorie de molécules dans l'épiderme des pommes : les phytosanitaires. Il s'agit de produits de traitement dont l'intérêt est de protéger les cultures contre les agresseurs afin d'assurer un développement et une conservation optimale jusqu'à leur utilisation ou leur consommation. Il existe trois principales catégories de phytosanitaires : les insecticides, les fongicides et les herbicides (Cf. § I- 1. 6.), qui correspondent à des molécules couvrant un très large spectre de fonctions chimiques tels que les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates, les pyréthriinoïdes, les nicotinoïdes... En règle générale, il s'agit de molécules au caractère plutôt hydrophobe (coefficients de partage octanol/eau $\log K_{O/E}$ élevés) et de masse moléculaire faible (< 1000 Da) qui leur permettent de pénétrer la cuticule hydrophobe des végétaux (Cf. § I- 3. 3. 2.) mais qui sont aussi responsables d'une rémanence plus ou moins marquée aussi bien dans les matrices végétales que dans l'environnement.

Les produits phytosanitaires de traitement sont en règle générale appliqués sous forme de solutions aqueuses par vaporisation. Les gouttelettes atteignent la surface des végétaux et le processus de pénétration en phase humide commence (Cf. § I- 3. 2.). Les solutés non ioniques et l'eau pénètrent *via* la voie de diffusion apolaire des végétaux, c'est-à-dire par la cuticule, et en particulier grâce à une sorption et une diffusion au travers des structures amorphes de la cuticule. Ils se désorbent dans le compartiment de sorption, qui correspond aux cellules épidermiques (parois cellulaires, cytoplasme). Les molécules de phytosanitaires se concentrent majoritairement dans l'épiderme des pommes (Cf. § I- 3. 4.).

La complexité des structures amorphes mais surtout cristallines va définir la mobilité des solutés dans la cuticule : plus les structures cristallines seront abondantes et de chaînes longues, plus les coefficients de diffusion des solutés seront faibles (Cf. § I- 2. 5. 2.).

Les pommes font partie des cultures maraîchères particulièrement traitées (Cf. § I- 1. 6. et I- 1. 6. 3.). Dans le Sud-Ouest de la France, les vergers sont traités en prévision et en cure des risques encourus selon la saison, les conditions météorologiques et la période de récolte. Les molécules les plus fréquemment appliquées sont présentées dans le tableau I-10.

Selon les phytosanitaires utilisés, il existe des délais à respecter entre la dernière vaporisation au verger et la récolte des fruits. Par exemple, dans le cas des traitements antifongiques de conservation (contre les pourritures, gloeosporiose...) les plus utilisés dans les vergers du Sud-Ouest, l'application des phytosanitaires doit respecter les délais avant récolte préconisés (DAR) : 28 jours pour le captane, 14 jours pour le dithianon, 7 jours pour le boscalid et la pyraclostrobine et 3 jours seulement pour le

fludioxonil. L'application est toujours liée aux conditions météorologiques, en particulier si celles-ci sont pluvieuses.

Le nombre d'applications par phytosanitaire est également limité. Par exemple, le captane est limité à 6 applications maximum par an d'où l'usage du dithianon en alternance pour traiter les pommes Gala. Toutefois, les molécules dont la rémanence est importante, comme le dithianon, doivent être évitées autant que possible.

Enfin, les critères clients sont importants car certains clients n'achètent un lot que lorsqu'il est garanti avec maximum quatre molécules phytosanitaires tracées, d'où l'importance du nombre de traitements avant récolte et de leur nature (Ex : la spécialité commerciale Bellis équivaut à deux molécules phytosanitaires boscalid + pyraclostrobine, forte rémanence du dithianon...).

3. 5. 2. Mobilité du fludioxonil dans la cuticule des pommes Fuji

Dans cette dernière partie de l'étude, nous nous sommes intéressés aux interactions phytosanitaires-cuticules des pommes au travers d'une étude de la dynamique du fludioxonil, un fongicide de la famille des phénylpyrroles, caractérisé par un cycle pyrrole et deux atomes de fluor, par RMN du ^{19}F en milieu solide dans les différentes composantes des cuticules de pommes Fuji (variété 2). Pour cela, différents échantillons de fludioxonil étalon chimique, de sa forme commerciale Geoxe et de fludioxonil sorbé (sous sa forme Geoxe) dans les cuticules entières/décirées et les cires des pommes (Cf. protocoles § 2. 8.) ont été analysés par RMN ^{19}F du solide (Figure II-39). La mobilité de la molécule de fludioxonil, en présence ou non d'un accélérateur de mobilité, dans chaque composante a été évaluée à partir des mesures de l'intensité du signal du fluor, des déplacements chimiques δ (ppm) ainsi que des largeurs de raie à mi-hauteur $\Delta\nu_{1/2}$ (Hz).

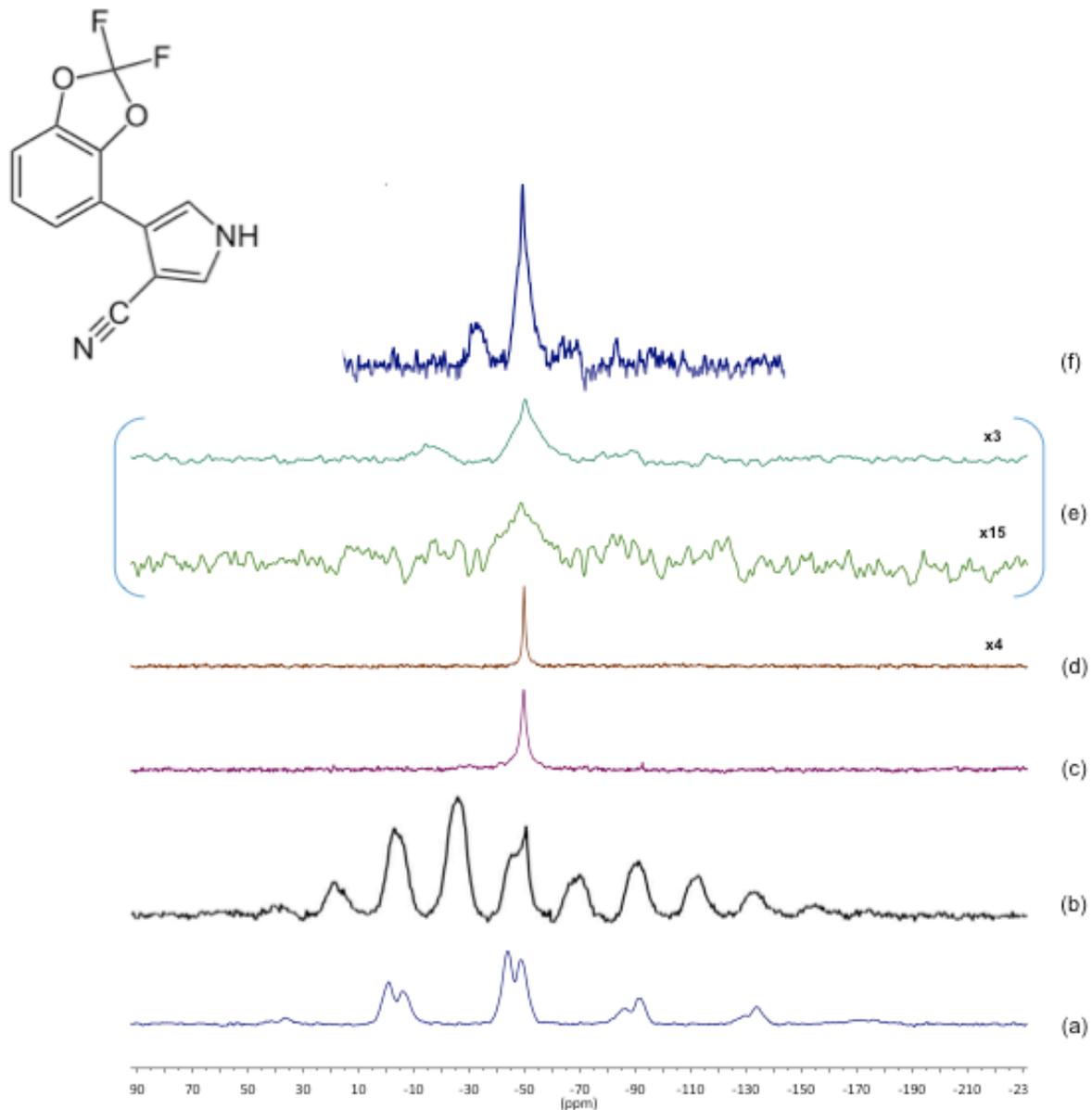


Figure II-39 : Spectres RMN du ^{19}F en milieu solide du fludioxonil étalon chimique (a), du Geoxe (b), du fludioxonil sorbé à 0,14 % dans les cuticules entières (c), à 0,14 % dans les cuticules décirées (d), à 0,14 % dans les cires (e) et à 1,4 % dans les cires (f)

Le spectre typique de l'étalon chimique de fludioxonil montre des raies larges et plusieurs bandes de rotation (Figure II-39, (a)). Ce spectre est typique d'un solide cristallin qui présente une anisotropie de déplacement chimique importante (CSA). Les 2 résonances avec des déplacements chimiques, δ égaux à - 43,85 et - 49,10 ppm (largeur de raie à mi-hauteur, $\Delta\nu_{1/2}$, de 1290 et 1570 Hz, respectivement) correspondent aux signaux isotropes. La présence de 2 résonances différentes peut indiquer soit que les deux ^{19}F du fludioxonil ont des environnements électroniques différents, soit l'existence de deux formes cristallines polymorphiques différentes. Les autres signaux correspondent à des bandes de rotation (situées à des fréquences égales à $\pm 1,2$ fois la vitesse de rotation par rapport aux signaux isotropes). Ces bandes de rotation se trouvent dans l'enveloppe correspondant au CSA des noyaux ^{19}F du fludioxonil qui a été estimé par simulation à 29,7 kHz et 35,7 kHz pour les résonances à - 43,85 et - 49,10 ppm, respectivement.

Lorsque le fludioxonil est incorporé à 50 % dans le Geoxe (Figure II-39, (b)), il apparaît deux composantes dans le spectre : une similaire au fludioxonil étalon chimique avec les bandes de rotation qui est largement majoritaire et une seconde espèce minoritaire de fludioxonil mobile qui est très proche de celle identifiée dans les cuticules entières (Figure II-39, (c)). La présence de tensioactifs dans la formule commerciale de Geoxe (10-15 % de sels de sodium de l'acide naphthalènesulfonique polymérisé avec le formaldéhyde, 1-5 % de sels de sodium de l'acide (Z)-2-[méthyl(1-oxo-9-octadécényl)amino]-éthanesulfonique) tend à augmenter la mobilité d'une partie du fludioxonil, indiquant qu'une interaction entre les deux confère aux atomes de fluor concernés un environnement électronique similaire. Certains tensioactifs dits accélérateurs actifs ou encore plastifiants jouent le rôle d'accélérateurs de la mobilité des solutés dans les cuticules (Cf. § I- 3. 3. 3. a-).

Dans le cadre de cette étude, nous avons choisi comme plastifiant une molécule de volume molaire relativement petit, peu hydrophile ($\log K_{O/E} > 0$) et possédant des propriétés en tant que solvant : le triacétate de glycérol ou triacétine. Le fludioxonil a été sorbé dans les cuticules entières, décirées et les cires de pommes Fuji. La triacétine a ensuite été sorbée dans les échantillons puis éliminée par rinçage (Cf. protocoles § 2. 8.). Les paramètres visant à évaluer la dynamique du fludioxonil dans les différentes composantes figurent dans le Tableau II-19.

Echantillon	Intensité signal F / masse échantillon en mg	Déplacement chimique δ (ppm)	Largeur de raie $\Delta\nu_{1/2}$ (ms)
Cuticules entières + 0,14 % fludioxonil	0,1344 \pm 0,0015	- 49,65 \pm 0,04	570 \pm 174
Cuticules entières + 0,14 % fludioxonil après rinçage	0,0394 \pm 0,0047	- 49,67 \pm 0,08	710 \pm 14
Cuticules entières + 0,14 % fludioxonil + E1518	0,0413	- 49,88 - 50,38	700 110
Cuticules entières + 0,14 % fludioxonil + E1518 après rinçage	0,0120	- 49,64	480
Cires + 0,14 % fludioxonil	0,0122	48,65	4600
Cires + 0,14 % fludioxonil après rinçage	Non détecté	-	-
Cires + 0,14 % fludioxonil + E1518 après rinçage	Non réalisé		
Cires + 1,4 % fludioxonil	0,0656	- 49,93 - 50,03	4400 280
Cires + 1,4 % fludioxonil après rinçage	0,0035	- 51,24	630
Cires + 1,4 % fludioxonil + E1518 après rinçage	Non détecté	-	-
Cuticules décirées + 0,14 % fludioxonil	0,0381	- 49,7	250
Cuticules décirées + 0,14 % fludioxonil après rinçage	0,0093	- 49,64	410
Cuticules décirées + 0,14 % fludioxonil + E1518 après rinçage	0,0062	- 49,83	210
Cuticules décirées + 5 % fludioxonil	0,5835	- 49,77	210
Cuticules décirées + 5 % fludioxonil après rinçage	0,0776	- 49,69	240
Cuticules décirées + 5 % fludioxonil + E1518 après rinçage	0,0180	- 49,77	260

Tableau II-19 : Grandeurs dynamiques du fludioxonil sorbé dans les cuticules entières, décirées et les cires totales de pommes (Variété 2)

- Lorsque le fludioxonil est incorporé à 0,14 % dans la cuticule entière (Figure II-39, (c)), les bandes de rotation disparaissent et il ne subsiste qu'une seule raie à - 49,65 ppm plus fine que le fludioxonil seul ($\Delta\nu_{1/2} = 570 \pm 174$ Hz). Ce résultat indique que le CSA des ^{19}F du fludioxonil a été moyenné à zéro. Ceci est possible si la mobilité locale du fludioxonil a fortement augmenté, ce qui explique également l'affinement des résonances (comportement proche d'une phase liquide). De plus, le fait d'observer un signal ^{19}F unique indique que les atomes de fluor de toutes les molécules de fludioxonil absorbées dans la cuticule ont un environnement électronique similaire. L'autre possibilité est que le signal ^{19}F observé est un signal moyen, qui provient d'un échange très rapide entre les différentes molécules de fludioxonil (ayant éventuellement des environnements différents) par rapport au temps spectral de le RMN (gamme de temps des ms). Cet échange pourrait être dû à la grande mobilité du fludioxonil dans les cuticules. Le rinçage de l'échantillon sous eau et éthanol élimine 71 % du fludioxonil sorbé et l'ajout de triacétine comme décontaminant avant rinçage élimine 20 % de fludioxonil supplémentaire.
- Lorsque le fludioxonil est incorporé à 0,14 % dans la cuticule décirée (Figure II-39, (d)), la largeur de la résonance ^{19}F s'affine avec $\Delta\nu_{1/2} = 210$ Hz mais la position du signal reste très similaire ($\delta = - 49,70$ ppm). Le fludioxonil est plus mobile que dans la cuticule entière. La cuticule décirée n'absorbe que 28 % du fludioxonil par rapport aux cuticules entières. Les cinétiques de sorption

du fludioxonil dans les cuticules entières et décirées doivent être différentes. Le rinçage de l'échantillon élimine 76 % du fludioxonil. L'ajout de triacétine n'élimine que 8 % de fludioxonil supplémentaire. Lorsque la concentration en fludioxonil est 50 fois plus élevée, l'intensité du signal n'augmente que d'un facteur 15. Le taux de sorption augmente 3 fois moins que la concentration de fludioxonil. Le rinçage élimine 87 % du fludioxonil et l'ajout de triacétine élimine 10 % de fludioxonil supplémentaire. Quelle que soit la quantité de fludioxonil sorbé dans la cuticule décirée, les taux d'extraction obtenus après lavage et après décontamination par la triacétine sont similaires.

- Lorsque le fludioxonil est incorporé à 0,14 % dans les cires, le signal se déplace ($\delta = -48,65$ ppm) et s'élargit considérablement avec $\Delta\nu_{1/2} = 4600$ Hz (Figure II-39, (e)). Le taux de fludioxonil sorbé dans les cires est de 9,1 % par rapport aux cuticules entières. L'élargissement conséquent de la résonance ^{19}F indique que l'environnement électronique de l'atome de fluor est beaucoup plus hétérogène dans les cires (désordre structural) et que sa mobilité locale est plus faible. Les cires absorbent 10 fois moins de fludioxonil que les cuticules entières et 3 fois moins que les cuticules décirées. La cinétique de sorption du fludioxonil dans les cires doit être encore plus limitée que celle dans les cuticules décirées. A 1,4 % (Figure II-39, (f)), l'intensité du signal est 5 fois plus élevée que celle à 0,14 %. Mais surtout, le signal présente deux contributions : une raie majoritaire très large ($\delta = -49,93$, $\Delta\nu_{1/2} = 4400$ Hz) et une raie minoritaire plus fine avec $\Delta\nu_{1/2} = 580$ Hz et $\delta = -50,03$. De plus, quelques bandes de rotation sont de nouveau observées. Ces résultats indiquent que la majorité du fludioxonil dans les cires se trouve dans un environnement moins mobile, comme ralenti par un phénomène qui pourrait être une sorption sur une surface rigide. Or les cires sont caractérisées par 50 % de structures rigides (Cf. § 3. 4. 1.) sur lesquelles le fludioxonil peut interagir. Une autre partie du fludioxonil se situe dans une zone plus mobile (raie fine). Le rinçage élimine la totalité du fludioxonil sorbé à 0,14 % et 95 % du fludioxonil sorbé à 1,4 %. L'ajout de triacétine permet d'éliminer les 5 % résiduels.

Ces résultats démontrent que les cinétiques de sorption sont différentes entre les trois matrices. La sorption est limitée dans les cires (10 %) et la cuticule décirée (28 %). Elle est plus forte dans la cuticule entière comme si l'arrangement moléculaire des structures augmentait l'assimilation. Cette hypothèse devra cependant être vérifiée avec de nouvelles mesures. Toutefois, l'analyse des échantillons par calorimétrie différentielle à balayage (Cf. § 3. 4. 2.) a montré que la température de transition vitreuse T_g de la cuticule décirée est égale à -26°C et qu'elle descend à $-35,9^\circ\text{C}$ dans la cuticule entière. La présence des cires repousse la phase vitreuse : elles jouent le rôle de plastifiant et peut faciliter la pénétration des phytosanitaires. Dans les cires, la totalité du fludioxonil est facilement éliminée : il est donc peu lié aux cires. Elles ne servent que de barrière à la diffusion dans la cuticule (Bauer et Schönherr 1992 [55]). En revanche, dans la cuticule décirée, l'élimination du fludioxonil est ralentie et l'ajout de triacétine n'augmente que peu le rendement d'extraction. L'affinité fludioxonil-cuticule est donc beaucoup plus marquée. En terme de mobilité, le fludioxonil est très mobile dans la cuticule et deux mobilités différentes existent dans les cires : une mobilité importante d'une part (minoritaire) et une autre plus limitée (majoritaire).

Schreiber *et al.* en 1997 [18] ont étudié la sorption de deux solutés de polarité distincte, l'acide oléique et le dotriacontane dans les cires cristallisées de feuilles de *Hordeum vulgare* par RMN du ^1H . Leur expérience a montré que l'acide oléique se dispersait dans un environnement d'ordre peu élevé dans lequel l'ajout de tensioactif augmente la mobilité. Le dotriacontane beaucoup plus apolaire se situe dans un environnement différent de celui de l'acide et en particulier dans deux environnements

distincts, plus rigides auxquels le tensioactif n'a pas accès puisqu'il ne modifie pas la mobilité. La représentation schématique de la sorption de ces deux molécules dans les cires de *H. vulgare* que proposent les auteurs, montre que les deux molécules se répartissent dans les zones amorphes des cires au sein du cristal d'hexacosanol majoritaire. Les molécules d'acide figurent dans des sortes de canaux tandis que celles de dotriacontane remplissent des sortes de cavités amorphes plus ou moins isolées des canaux.

Dans notre étude, les modifications des spectres du ^{19}F qui ont été observées (affinement de la largeur des raies, disparition des bandes de rotation, modification du déplacement chimique) peuvent être identifiées à celles observées pour la molécule d'ibuprofène après encapsulation dans différents solides mésoporeux (Skorupska *et al.* 2013 [56]). L'analyse des spectres de ^{13}C RMN par CP-MAS de l'ibuprofène et de l'ibuprofène en milieu poreux démontrent que la molécule devient beaucoup plus mobile dans un pore que dans son état initial cristallin.

Dans les cuticules, la répartition du fludioxonil est moyennée entre les cires et la cutine. Les molécules de fludioxonil se répartissent dans la matrice dans deux environnements distincts :

- l'un majoritaire dans lequel la mobilité est importante au sein de la matrice,
 - soit par solvatation par certaines molécules du milieu,
 - soit parce qu'elles se localisent dans une zone très mobile voire liquide de la matrice,
 - soit parce qu'elles se localisent dans des « pores » qui vont isoler les molécules et limiter les interactions moléculaires;
- l'autre minoritaire dans lequel la mobilité est plus limitée, consistant probablement en une interaction avec les cires cristallines et/ou solides amorphes à l'interface de la matrice amorphe.

Une étude sur la dynamique d'adsorption et de désorption du cyprodinil et du fludioxonil dans les sols a rapporté que le cyprodinil était en forte interaction avec la matière organique des sols à travers deux mécanismes : l'un de séquestration par l'humine et l'autre par liaison covalente avec les acides humiques (Arias *et al.* 2005 [57]). Il a été montré, lors de nos travaux sur l'étude des effets matrices en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse tandem (Cf. chapitre III), que le fludioxonil subit un effet matrice marqué induit par la matrice peau de la pomme parce qu'il est en forte interaction avec les acides oléanolique/ursolique qui représentent environ 16 % de la masse de la cuticule. Les acides triterpéniques sont les constituants majoritaires amorphes des cires intracuticulaires (Tsubaki *et al.* 2013 [58]). Une interaction forte entre le fludioxonil et les acides triterpéniques dans les parties amorphes solides de la matrice pourrait expliquer le signal ^{19}F large observé (hétérogénéité structurale) avec les cires ainsi que la réapparition de bandes de rotation pour l'échantillon à 1,4 % (mobilité réduite) (Figure II-39, (e) et (f)). Dans la cuticule entière, elle pourrait correspondre à l'interaction minoritaire qui contribue à l'élargissement du signal (Figure II-39, (b) par rapport au signal dans la cuticule décirée (Figure II-39, (c)).

Ces différentes observations nous ont amenés à proposer un schéma des différentes possibilités d'organisation structurale spatiale du fludioxonil dans la membrane cuticulaire (Figure II-40).

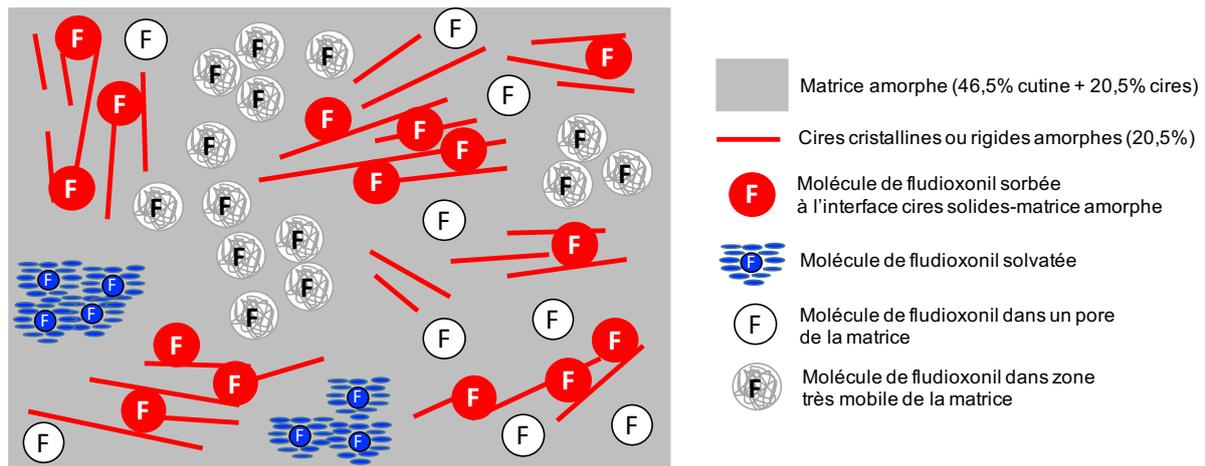


Figure II-40 : Schéma théorique des différentes possibilités de l'organisation structurale du fludioxonil dans la cuticule des pommes

4. Conclusions

L'épiderme des pommes, communément désigné par le terme de peau, est une membrane complexe qui recouvre le réceptacle charnu *i.e.* la chair du fruit. Ici, l'épiderme est cutinisé, c'est-à-dire recouvert d'une couche extracellulaire exclusivement caractérisée par des lipides. Ces derniers se divisent en deux grandes catégories : les cires cuticulaires et le polymère de cutine/cutane.

Dans cette étude, dans un premier temps, les épidermes ont été fractionnés selon quatre voies afin d'identifier leur composition physico-chimique et d'étudier leur structure. La voie 1 de fractionnement correspond à une analyse directe des épidermes pelés et lyophilisés pour dresser un bilan matière général, qui a été complété par le taux de lipides évalués à partir des échantillons d'épidermes lysés obtenus selon la voie 2 de fractionnement. La composition chimique des cires a été étudiée à partir des échantillons de la voie 2 mais également de la voie 4 de fractionnement, qui propose une extraction des cires par immersion des pommes dans des solvants de polarité croissante, permettant ainsi une première séparation des molécules des cires sur la base de leurs différentes solubilités. L'extraction sélective des cires épicuticulaires a été approchée dans la voie 3 de fractionnement par moyens mécaniques (friction, adhésion). A défaut d'extraire sélectivement les cires épi- des cires intracuticulaires, les cires épicuticulaires ont fait l'objet d'une étude par MEB.

Les bilans matières des épidermes des pommes Gala (VAR1), Fuji (VAR2) et Pink Lady® (VAR3) sont présentés dans le Tableau II-20 récapitulatif.

Variété	Gala (VAR1)	Fuji (VAR2)	Pink Lady® (VAR3)
Calibre (diamètre en mm)	65 - 70	70 - 75	70 - 75
Epiderme (% poids frais fruits)	8,0 - 10,4	6,6 - 7,7	7,6 - 9,9
Minéraux (% MS épiderme)	1,7	2,5	2,0
Protéines (% MS épiderme)	2,4	3,1	2,6
Sucres libres (% MS épiderme) dont (% massique) :	55,4	44,1	29,3
fructose	44,4	41,4	39,4
glucose	18,9	24,4	15,9
saccharose	34,1	28,0	41,5
sorbitol	2,6	6,2	3,3
Acides organiques (% MS épiderme)	Non détectés	Non détectés	Non détectés
Pectines (% MS épiderme)	15,7	17,6	20,7
Fibres (% MS épiderme) dont (% massique) :	20,2	20,1	27,5
cellulose	72,7	87,4	70,1
hémicelluloses	8,3	2,0	6,1
lignines	19,0	23,1	23,8
Lipides (% MS épiderme) dont (% massique) :	11,8	13,2	14,7
cires totales	38,9	42,7	42,2
cutine	48,9	45,2	46,3
cutane	6,8	6,8	4,8
Cires totales (mg/cm ² d'épiderme) dont (% massique) :	0,931	0,870	1,277
acide ursolique	8,4	12,9	14,0
acide oléanolique	16,3	23,9	25,0
uvaol	4,7	3,7	4,3
heptacosane C27	1,0	0,3	0,7
nonacosane C29	12,4	5,9	6,0
Autres alcanes (C23-C26, C28, C32)	0,5	0,3	0,4
esters	21,5	21,3	21,1
glucides libres résiduels	0,2	0,1	0,1
autres (alcools, acides gras, diols, cétones...)	35,0	32,0	28,0
Hydrophobicité de la surface (angle de goutte en deg à 25°C)	104,4	94,4	80,8
Morphologie des cires épicuticulaires (cryo-MEB)	3D	2D + reliefs 3D	2D
Caractérisation amorphe/cristallin par RX :			
Cires % amorphe	52,3	49,1	50,2
% cristallin	47,7	50,9	49,8
Cutine % amorphe	100	100	100
% cristallin	0	0	0
Cuticule % amorphe	79,3	78,4	79,3
% cristallin	20,7	21,6	20,7
Transition vitreuse (°C) :			
cires	non détectée	non détectée	non détectée
cutine	- 25,2	- 26,0	- 22,5
cuticule	- 38,1	- 35,9	- 33,0
Transitions 1 ^{er} ordre (°C) :			
cires	50,5 / 59,1	55,7 / 61,4	52,4 / 61,2
cutine	53,8 / 62,8 / 70,1	non détectées	52,1 / 58,2 / 68,4
cuticule	53,7 / 58,9	57,2 / 65,9	40,8 / 76,5
Caractérisation structurale par RMN ¹³ C :			
cires	Structures cristallines, amorphes solides et de mobilité intermédiaire.		
cutine	Structures amorphes solides et très mobiles.		
cuticule	Structures cristallines, amorphes solides et très mobiles		

Tableau II-20 : Bilan récapitulatif des caractérisations physico-chimiques et structurales des épidermes de pommes (Variétés 1, 2 et 3)

L'épiderme représente environ 10 % en masse des pommes Gala et Pink Lady® et 7 % seulement de la Fuji. Les taux de minéraux et de protéines varient peu et sont de l'ordre de 2 % et 2,5 % en masse

sèche de l'épiderme respectivement. Aucun acide organique (malique et citrique) n'a été détecté. Les teneurs en glucides libres tendent à diminuer en fonction de la période de maturation des pommes : Gala (Août) > Fuji (Octobre) > Pink (Décembre). Toutefois, les teneurs massiques relatives en fructose et en glucose varient peu d'une espèce à l'autre, de l'ordre de 40 % et de 20 % respectivement. Le ratio fructose/glucose est de 2. En revanche, les teneurs en saccharose et en sorbitol sont beaucoup plus variables. Le saccharose représente 42 % des glucides libres identifiés dans l'échantillon d'épiderme de Pink Lady® alors qu'il n'est que de 28 % dans l'échantillon d'épiderme de Fuji. La proportion de sorbitol est la plus élevée dans l'échantillon d'épiderme de Fuji atteignant 6 %, soit deux fois plus que pour les deux autres échantillons. Les taux de pectines tendent à augmenter tout au long de la période de maturation des trois variétés, et les taux de fibres (hémicelluloses, cellulose, lignines), identiques pour les variétés 1 et 2 sont plus élevés pour la variété 3, indiquant que la densité cellulaire épidermique est plus importante pour la Pink Lady®. Toutefois, les teneurs relatives en cellulose, hémicelluloses et lignines sont similaires dans les échantillons d'épidermes de Gala et de Pink (respectivement 70 %, 8 % et 20 % environ). Dans l'échantillon d'épiderme de Fuji, le taux de cellulose est beaucoup plus élevé (presque 90 %) tandis que le taux d'hémicelluloses est 4 fois plus faible. Le taux de lignines est similaire (20 %). A l'instar des teneurs en pectines et en fibres, et à la différence des teneurs en glucides libres, les teneurs en lipides tendent à augmenter au cours de la saison de récolte. Mais quelle que soit la variété, les teneurs relatives en cires, cutine et cutane sont similaires et stables, à environ 41 %, 46 % et 5 % respectivement.

0,9 mg de cires cuticulaires totales par cm² d'épiderme de pommes Gala et Fuji a été extrait par solvant au Soxhlet suite aux lyses enzymatiques. 1,3 mg de cires par cm² d'épiderme de pommes Pink Lady® ont été extraits, soit 1,4 fois plus, indiquant que l'épiderme de la Pink Lady® est le plus riche en cires. Ce paramètre est peut-être lié à la densité cellulaire, également plus élevée pour cette variété. Environ 70 % des composés chimiques des cires ont été identifiés et quantifiés (triterpénoïdes, esters et alcanes). Les deux principales différences résident dans les taux d'acides triterpéniques et d'alcanes, en particulier le nonacosane (alcane majoritaire à près de 90 %). Les cires de la Gala sont plus riches en C29 (12 %) et moins riches en acides triterpéniques (25 %) que celles de la Fuji (respectivement 6 % et 36,8 %) et de la Pink Lady® (respectivement 6 % et 39 %). Quelle que soit la variété, l'acide oléanolique est l'acide triterpénique majoritaire (65 %) face à l'acide ursolique. Le taux d'esters a été estimé stable pour les trois variétés autour de 21 %. La composition des esters n'a pas été déterminée. La mouillabilité des épidermes a été évaluée à partir de la mesure de l'angle formée par une goutte d'eau à la surface. L'épiderme des variétés 1 et 2 sont hydrophobes (Gala étant plus hydrophobe que Fuji) tandis que celui de la variété 3 est hydrophile. Plus les cires sont riches en acides triterpéniques, plus l'angle de goutte diminue. Plus les cires sont riches en alcanes, plus l'angle de goutte augmente. La mouillabilité de la surface est également liée à la disposition des cires et de leurs cristaux. Les épidermes frais des pommes ont été observés au MEB sur platine cryo. Conformément à ce qui est décrit dans la littérature, deux dispositions ont été identifiées : une disposition dans laquelle les cires s'organisent selon un axe transversal à la surface de l'épiderme qui est qualifiée de 3D, et une seconde disposition dans laquelle les cires s'organisent dans le sens longitudinal de la surface de l'épiderme et qui est qualifiée de 2D. Une organisation en 3D des cires et de leurs cristaux confèrent à la surface un caractère peu mouillable (angle de goutte élevé). C'est le cas des épidermes de Gala (plaquettes verticales) et de Fuji (surface croûteuse et granuleuse, avec des plaquettes horizontales qui se décollent de la surface et par endroit des tubules). Dans le cas d'une organisation en 2D, les structures 3D sont minimales et les surfaces sont plus mouillables (angle de goutte faible). C'est le cas des épidermes de Pink Lady®.

Dans un second temps, la structure des cuticules a été abordée au travers de l'évaluation du ratio amorphe/cristallin par diffraction des RX, de la mesure des transitions vitreuses, et de l'étude des structures rigides, moyennement mobiles et très mobiles par RMN du ^{13}C solide (CP-MAS, DP-MAS et INEPT-MAS). Le ratio amorphe/cristallin des cires est de 1:1 quelle que soit la variété, celui des cuticules décirées (donc par extension de la cutine qui représente alors 80 % en masse de la cuticule décirée) est de 1:0. La cutine, conformément à la littérature, ne contient aucune structure cristalline. Dans le cas des cuticules entières, quelle que soit la variété, le ratio amorphe/cristallin devient 4:1 et correspond à la quantité de structures cristallines apportées par les 41 % massiques de cires dans la cuticule entière. Par conséquent, la Pink Lady étant la plus riche en cires, sa cuticule sera caractérisée par plus de structures cristallines que les deux autres variétés : 0,26 mg de cires cristallines par cm^2 d'épidermes contre 0,19 mg/cm^2 respectivement. Par conséquent, la mobilité des solutés dans la cuticule des pommes Pink Lady® devrait être plus faible que dans celles des pommes Gala et Fuji.

La cuticule est un biopolymère semi-cristallin avec des parties amorphes. Elle possède donc une ou plusieurs température(s) de transition vitreuse, mais elles sont très difficilement mesurables. En effet, plus le taux de cristallinité augmente (cuticules décirées = cutine < cuticules entières < cires), plus l'énergie engagée dans la transition de second ordre est faible. Des transitions vitreuses ont pu être détectées et mesurées dans les cuticules décirées (de - 22 à - 26°C) et dans les cuticules entières (- 33 à - 38°C). La présence des cires entraînent une baisse des températures de transition vitreuse : les cires semblent donc présenter une fonction plastifiante de la cuticule. Notons que la teneur en polysaccharides résiduels des échantillons analysés est de l'ordre de 5 à 7 %. Ces résultats sont conformes à ceux de la littérature. Des températures relatives à des transitions de 1^{er} ordre ont également été relevées. Dans le cas des cires, elles correspondent aux températures de fusion des différentes structures : (structures cristallines =>) structures amorphes solides => structures amorphes liquides => liquides. Dans le cas des cuticules décirées, il s'agirait plutôt d'une transition de 2nd ordre du polymère qui impliquerait des changements de conformation mineurs, sans mouvement au niveau des chaînes principales. Dans la cuticule entière, les deux événements relatifs aux modifications mineures du polymère de cutine et aux fusions des cires se superposent.

Les différentes analyses des lipides cuticulaires par RMN ^{13}C du solide doivent être interprétées avec beaucoup de précaution car le caractère amorphe/cristallin ne doit pas être réduit au caractère mobile/rigide des structures, comme c'est le cas de nombreux travaux de la littérature. La preuve en est que les trois séries d'analyses (CP-MAS, DP-MAS et INEPT-MAS) ont mis en évidence l'existence de composés amorphes rigides (cires, cuticules entières et décirées) aux côtés de composés cristallins rigides (cires et cuticules entières) et de structures très mobiles (uniquement dans les cuticules entières et décirées).

Cette étude n'a pas permis d'élucider l'ultrastructure du biopolymère avec ses cires. Les observations par MEB sembleraient montrer que les molécules du polymère de cutine s'organisent selon un axe vertical dans l'épaisseur de la cuticule et donc perpendiculaire à la surface de l'épiderme, sur lequel les cires s'adcrusteraient selon une direction plutôt horizontale, à l'instar des cires épicuticulaires. La répartition des cires n'est pas homogène. La densité est plus élevée dans les lenticelles et les craquelures sur la face externe de la cuticule mais aussi sur les reliefs de la face interne des cuticules, aux endroits où la couche cuticulaire plonge entre les cellules épidermiques. La cuticule est une membrane totalement inhomogène à la fois chimiquement et structurellement. Cette inhomogénéité s'exerce en 3D, sur un double plan : transversal et longitudinal (Figure II-41).

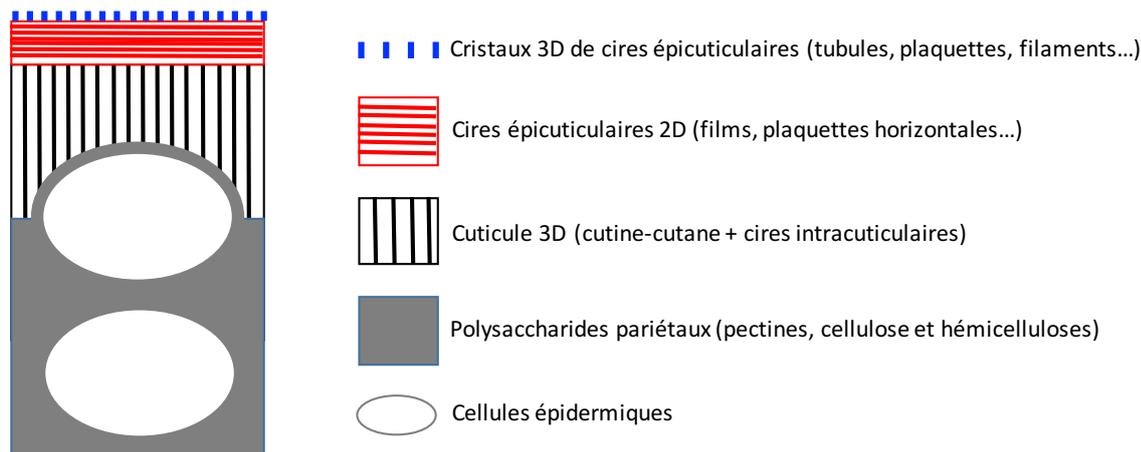


Figure II-41 : Proposition d'un schéma possible de l'ultrastructure de la cuticule des pommes en coupe transversale

Une des conséquences dans notre étude concerne la répartition des molécules de phytosanitaires. Non seulement, leur répartition sera elle aussi inhomogène dans l'épiderme (différence de sorption) mais elles seront dans des environnements variables dans lesquels leur mobilité est engagée. Nous avons étudié la mobilité des molécules d'un fongicide fluoré très utilisé pour la conservation des pommes contre le développement de la tavelure en verger et en chambres de stockage, le fludioxonil, dans les cuticules de pommes Fuji (variété 2), entières et décirées, ainsi que dans leurs cires. L'interaction fludioxonil-cires est très faible. Il existe deux mobilités du fludioxonil dans les cires. La mobilité la plus limitée est majoritaire. En revanche, l'interaction est beaucoup plus importante avec la cuticule décirée, donc avec la cutine, et l'espèce est très mobile. Dans la cuticule entière, la répartition du fludioxonil est moyennée entre les cires et la cutine. Les molécules de fludioxonil se répartissent dans la matrice dans deux environnements distincts :

- l'un majoritaire dans lequel la mobilité est importante au sein de la matrice. Ce gain de mobilité par rapport au fludioxonil de référence (étalon chimique pur, ou dilution à 50 % dans la préparation commerciale) peut être expliqué par trois hypothèses, (i) les molécules de fludioxonil peuvent être solvatées par certaines molécules du milieu, peut-être par les plastifiants de la formule commerciale, (ii) elles peuvent aussi se localiser après sorption dans une zone très mobile voire liquide de la matrice et (iii) elles pourraient se localiser dans des « pores » de la matrice qui vont isoler les molécules et limiter les interactions moléculaires et nous avons supposé que dans ce cas, le fludioxonil était en interaction avec la cutine,
- et l'autre minoritaire dans lequel la mobilité est plus limitée, consistant probablement en une interaction avec les cires cristallines et/ou solides amorphes à l'interface de la matrice amorphe. Il a été supposé que les acides triterpéniques pouvaient intervenir à ce niveau.

Remerciements

Nous tenons à remercier les équipes de la plateforme Toulouse Réseau Imagerie T.R.I. Genotoul et en particulier Dr B. Payré et Monsieur D. Goudounèche du Centre de Microscopie Electronique Appliqué à la Biologie (CMEAB), ainsi que les services communs de RMN de l'Institut de Chimie de Toulouse et en particulier Messieurs P. Lavedan et M. Vedrenne de l'Université P. Sabatier et Dr Y. Coppel du Laboratoire de Chimie de Coordination. Les auteurs remercient également Dr G. Denis pour l'accès à l'analyseur de diffraction par RX.

Références bibliographiques

- [1] L. Guiavarch, La pomme en 2014-2015 (2015). <http://www.franceagrimer.fr/content/download/40897/381190/file/BIL-POMME-camp%202014-15.pdf> (consulté le 01 Mars 2016).
- [2] Chambre d'Agriculture Languedoc-Roussillon Midi-Pyrénées, Cerfrance, L'arboriculture (2016). http://www.lrmp.chambagri.fr/uploads/media/agricopie2016_arboriculturep22.pdf (consulté le 01 Mars 2016).
- [3] Chambre d'Agriculture Midi-Pyrénées, Cerfrance, L'Arboriculture (2015). http://www.mp.chambagri.fr/IMG/pdf/agricopie2015_arboriculturep16.pdf (consulté le 01 Mars 2016).
- [4] Agreste, Midi-Pyrénées : modernisation du verger de pommiers (2008). <http://agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/R7308A04.pdf> (consulté le 01 Mars 2016).
- [5] M. Pollard, F. Beisson, Y. Li, J.B. Ohlrogge, Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin, *Trends Plant Sci.* 13 (2008) 236–246.
- [6] E.A. Baker, M.J. Bukovac, G.M. Hunt, Composition of tomato fruit cuticle as related to fruit growth and development, in: *Plant Cuticle*, London: Academic Press, Cutler DF, Alvin KL, Price CE, editors (1982) 33–44.
- [7] A. Konarska, Differences in the Fruit Peel Structures between Two Apple Cultivars During Storage, *Acta Sci. Pol.-Hortorum Cultus.* 11 (2012) 105–116.
- [8] W. Barthlott, C. Neinhuis, D. Cutler, F. Ditsch, I. Meusel, I. Theisen, H. Wilhelmi, Classification and terminology of plant epicuticular waxes, *Bot. J. Linn. Soc.* 126 (1998) 237–260. doi:10.1111/j.1095-8339.1998.tb02529.x.
- [9] C. Buschhaus, R. Jetter, Composition differences between epicuticular and intracuticular wax substructures: How do plants seal their epidermal surfaces?, *J. Exp. Bot.* 62 (2011) 841–853.
- [10] J.-P. Garrec, C. Henry, L. Le Maout, Cires épi- et intracuticulaires: Etude de leur séparation, de leurs caractéristiques chimiques et de leurs rôles respectifs dans la perméabilité cuticulaire, *Environ. Exp. Bot.* 35 (1995) 399–409.
- [11] P.J. Van Soest, R.H. Wine, Determination of lignin and cellulose in acid-detergent fiber with permanganate., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 51 (1968) 780–785.
- [12] G. Verardo, E. Pagani, P. Geatti, P. Martinuzzi, A thorough study of the surface wax of apple fruits, *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (2003) 659–667. doi:10.1007/s00216-003-1945-7.
- [13] Y. Li, B. Chen, Z. Chen, L. Zhu, Surfactant effects on the affinity of plant cuticles with organic pollutants, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 3681–3688. doi:10.1021/jf803917w.
- [14] M. Shechter, B. Xing, F.-D. Kopinke, B. Chefetz, Competitive sorption-desorption behavior of triazine herbicides with plant cuticular fractions, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 7761–7768. doi:10.1021/jf0614488.
- [15] C. Jaeger, F. Hemmann, EASY: a simple tool for simultaneously removing background, deadtime and acoustic ringing in quantitative NMR spectroscopy--part I: basic principle and applications, *Solid State Nucl. Magn. Reson.* 57–58 (2014) 22–28. doi:10.1016/j.ssnmr.2013.11.002.

- [16] M. Riederer, L. Schreiber, Waxes - The transport barriers of plant cuticles, in: R.J. Hamilton (Ed.), Waxes Chem. Mol. Biol. Funct., The Oily Press (1995).
- [17] E.C. Reynhardt, M. Riederer, Structures and molecular dynamics of plant waxes, Eur. Biophys. J. 23 (1994) 59–70. doi:10.1007/BF00192206.
- [18] L. Schreiber, K. Schorn, T. Heimbürg, 2H NMR study of cuticular wax isolated from *Hordeum vulgare* L. leaves: identification of amorphous and crystalline wax phases, Eur. Biophys. J. 26 (1997) 371–380. doi:10.1007/s002490050091.
- [19] P. Massiot, A. Baron, J.F. Drilleau, Characterisation and enzymatic hydrolysis of cell-wall polysaccharides from different tissue zones of apple, Carbohydr. Polym. 25 (1994) 145–154. doi:10.1016/0144-8617(94)90198-8.
- [20] M. Colin-Henrion, De la pomme à la pomme transformée : impact du procédé sur deux composés d'intérêt nutritionnel. Caractérisation physique et sensorielle des produits transformés, thèse de doctorat, Université d'Angers (2008).
- [21] G. Campeanu, G. Neata, G. Darjanschi, Chemical Composition of the Fruits of Several Apple Cultivars Growth as Biological Crop, Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca. 37 (2009) 161–164.
- [22] G. Bonnier, Revue Générale de Botanique, Librairie Générale de l'Enseignement, tome 70, N°831-832, La cire cuticulaire des pommes (*Pirus Malus* L.) (Etude morphologique, biochimique et physiologique) par P. Mazliak (1963).
- [23] B. Chen, Y. Li, Y. Guo, L. Zhu, J.L. Schnoor, Role of the Extractable Lipids and Polymeric Lipids in Sorption of Organic Contaminants onto Plant Cuticles, Environ. Sci. Technol. 42 (2008) 1517–1523. doi:10.1021/es7023725.
- [24] T. Dugé de Bernonville, Caractérisations histologique, moléculaire et biochimique des interactions compatible et incompatible entre *Erwinia amylovora*, agent du feu bactérien, et le pommier (*Malus x domestica*), thèse de doctorat, Université d'Angers (2009).
- [25] I. Lara, B. Belge, L.F. Goulao, A Focus on the Biosynthesis and Composition of Cuticle in Fruits, J. Agric. Food Chem. 63 (2015) 4005–4019. doi:10.1021/acs.jafc.5b00013.
- [26] J.A. Heredia-Guerrero, J.J. Benítez, E. Domínguez, I.S. Bayer, R. Cingolani, A. Athanassiou, A. Heredia, Infrared and Raman spectroscopic features of plant cuticles: a review, Plant Biophys. Model. 5 (2014) 14p. doi:10.3389/fpls.2014.00305.
- [27] E.J. Johnson, O. Dorot, J. Liu, B. Chefetz, B. Xing, Spectroscopic Characterization of Aliphatic Moieties in Four Plant Cuticles, Commun. Soil Sci. Plant Anal. 38 (2007) 2461–2478. doi:10.1080/00103620701588841.
- [28] T. Shepherd, D.W. Griffiths, The effects of stress on plant cuticular waxes, New Phytol. 171 (2006) 469–499.
- [29] E. Curry, Factors associated with apple lenticel breakdown, Washington State University, Tree Fruit Research and Extension Center (2003).
- [30] E. Curry, Effects of 1-MCP applied postharvest on epicuticular wax of apples (*Malus domestica* Borkh.) during storage, J. Sci. Food Agric. 88 (2008) 996–1006.
- [31] A. Szakiel, C. Paczkowski, F. Pensec, C. Bertsch, Fruit cuticular waxes as a source of biologically

active triterpenoids, *Phytochem. Rev.* 11 (2012) 263–284.

[32] E. Curry, Lenticel and cuticle disorders: a survey, in: Wash. Tree Fruit Postharvest Conf., Wenatchee, WA, March 13th and 14th 2001.

[33] S. Roy, W.S. Conway, A.E. Watada, C.E. Sams, E.F. Erbe, W.P. Wergin, Changes in the Ultrastructure of the Epicuticular Wax and Postharvest Calcium Uptake in Apples, *HortScience*. 34 (1999) 121–124.

[34] Z. Bouzoubâa, D. Domergue, L. René, Comparaison de la composition chimique des cires épicuticulaires des feuilles et des fruits de l'arganier et impact sur la conservation et la valorisation de cette espèce, in: Actes Prem. Congrès Int. Arganier, INRA/CRRA et Laboratoire de Biogénèse Membranaire de Bordeaux, Agadir, Maroc, (2011) 350–357.

[35] R. Veberic, M. Trobec, Herbinger, M. Hofer, D. Grill, F. Stampar, Phenolic compounds in some apple (*Malus domestica* Borkh) cultivars of organic and integrated production, *J. Sci. Food Agric.* (2005) 1687–1694.

[36] Mučaji P., Nagy M., Contribution to the TLC separation of ursolic and oleanolic acid mixture, *Acta Fac. Pharm. Univ. Comen.* 58 (2011) 56–61. doi:10.2478/v10219-011-0006-0.

[37] A.M.S. Fernandes, E.A. Baker, J.T. Martin, Studies on plant cuticle, *Ann. Appl. Biol.* 53 (1964) 43–58. doi:10.1111/j.1744-7348.1964.tb03779.x.

[38] Y. Lv, Triterpenes and phenolic compounds in apple fruit (*Malus domestica* Borkh.). Variation due to cultivar, sun exposure, rootstock, harvest maturity, bruising, fungi inoculation, ozone treatment and storage conditions, Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences (2016).

[39] C.G. Casado, A. Heredia, Structure and dynamics of reconstituted cuticular waxes of grape berry cuticle (*Vitis vinifera* L.), *J. Exp. Bot.* 50 (1999) 175–182. doi:10.1093/jxb/50.331.175.

[40] P.E. Kolattukudi, Natural Waxes on Fruit, *Inst. Biol. Chem. Wash. State Univ. Pullman*. 2 (1984) 3–7.

[41] P.J. Holloway, Chemistry of leaf waxes in relation to wetting, *J. Sci. Food Agric.* 20 (1969) 124–128. doi:10.1002/jsfa.2740200214.

[42] P.J. Holloway, The effects of superficial wax on leaf wettability, *Ann. Appl. Biol.* 63 (1969) 145–153. doi:10.1111/j.1744-7348.1969.tb05475.x.

[43] D.M. Hall, A Study of the Surface Wax Deposits on Apple Fruit, *Aust. J. Biol. Sci.* 19 (1966) 1017–1026.

[44] K. Koch, B. Bhushan, W. Barthlott, Diversity of structure, morphology and wetting of plant surfaces, *Soft Matter*. 4 (2008) 1943–1963. doi:10.1039/B804854A.

[45] L. Schreiber, J. Schönherr, Water and Solute Permeability of Plant Cuticles: Measurement and Data Analysis, Springer Science & Business Media (2009). 306p.

[46] R. Jetter, S. Schaffer, M. Riederer, Leaf cuticular waxes are arranged in chemically and mechanically distinct layers: evidence from *Prunus laurocerasus* L, *Plant Cell Environ.* 23 (2000) 619–628.

[47] R.T.S. Frighetto, R.M. Welendorf, E.N. Nigro, N. Frighetto, A.C. Siani, Isolation of ursolic acid from apple peels by high speed counter-current chromatography, *Food Chem.* 106 (2008) 767–771.

doi:10.1016/j.foodchem.2007.06.003.

- [48] P. Luque, A. Heredia, Glassy state in plant cuticules during growth, *Z. Für Naturforschung*. (1994) 273–275.
- [49] A.P. Deshmukh, A.J. Simpson, P.G. Hatcher, Evidence for cross-linking in tomato cutin using HR-MAS NMR spectroscopy, *Phytochemistry*. 64 (2003) 1163–1170.
- [50] B. Chen, B. Xing, Sorption and Conformational Characteristics of Reconstituted Plant Cuticular Waxes on Montmorillonite, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 8315–8323. doi:10.1021/es050840j.
- [51] A. Heredia, Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1620 (2003) 1–7. doi:10.1016/S0304-4165(02)00510-X.
- [52] A. Heredia, A. Matas, E. Domínguez, Investigating plant lipid biopolymers, *Biochem. Educ.* (2000) 50–51.
- [53] S. Thomas, D. Durand, C. Chassenieux, P. Jyotishkumar, *Handbook of Biopolymer-Based Materials: From Blends and Composites to Gels and Complex Networks*, John Wiley & Sons (2013). 1019p.
- [54] P.J. Holloway, Structure and histochemistry of plant cuticular membranes: an overview, in: D.F. Cutler, K.L. Alvin, C.E. Price (Eds.), *Plant Cuticle*, Academic Press, London, (1982) 1–32.
- [55] H. Bauer, J. Schönherr, Determination of mobilities of organic compounds in plant cuticles and correlation with molar volumes, *Pestic. Sci.* 35 (1992) 1–11. doi:10.1002/ps.2780350102.
- [56] E. Skorupska, A. Jeziorna, S. Kazmierski, M.J. Potrzebowski, Recent progress in solid-state NMR studies of drugs confined within drug delivery systems, *Solid State Nucl. Magn. Reson.* 57–58 (2014) 2–16. doi:10.1016/j.ssnmr.2013.12.001.
- [57] M. Arias, A.C. Torrente, E. López, B. Soto, J. Simal-Gándara, Adsorption–Desorption Dynamics of Cyprodinil and Fludioxonil in Vineyard Soils, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 5675–5681. doi:10.1021/jf048023a.
- [58] S. Tsubaki, K. Sugimura, Y. Teramoto, K. Yonemori, J. Azuma, Cuticular Membrane of *Fuyu Persimmon* Fruit Is Strengthened by Triterpenoid Nano-Fillers, *PLOS ONE*. 8 (2013) e75275. doi:10.1371/journal.pone.0075275.

CHAPITRE III

Effets matrice dans des extraits QuEChERS de pommes

Chapitre III Etude des effets matrice dans des extraits QuEChERS de pommes

1. Introduction

L'étude des résidus phytosanitaires dans les denrées alimentaires représente, d'un point de vue analytique, un véritable enjeu économique et de santé publique. Les développements importants de la spectrométrie de masse permettent aujourd'hui de quantifier plusieurs centaines de résidus en une seule analyse (méthodes multirésidus). Même si ce mode de détection peut s'avérer dans certains cas moins sensible que des détecteurs spécifiques (analyse des organochlorés au moyen d'une détection par capture d'électrons, cf Tableau I-25), la spécificité liée aux analyseurs et modes d'acquisition de la spectrométrie de masse a contribué à diminuer les limites de détection et de quantification en s'affranchissant considérablement des effets matrice (Cf. § I- 5. 3.).

Les effets matrice sont inhérents à l'analyse des résidus dans les denrées alimentaires. Il y a autant d'effets matrice que de matrices. Ils sont liés à la nature des molécules qui les composent et qui se solubilisent dans les solvants lors de l'extraction des molécules de phytosanitaires. Les lipides (triglycérides, phospholipides, acides gras...), les pigments (chlorophylles, caroténoïdes, anthocyanes...), les sucres et les acides organiques sont les principaux responsables, impliquant soit des effets matrice positifs (augmentation du signal), soit négatifs (extinction du signal). La méthode QuEChERS (Cf. § I- 5. 1. 3.) est utilisée en tant que méthode de base de préparation/purification d'extraits de différentes matrices ; néanmoins, elle nécessite quelques optimisations selon le type de matrice ou d'analyte étudié car les effets peuvent rester dans certaines conditions très marqués. C'est notamment le cas pour des extraits concentrés pour lesquels l'encrassement des systèmes d'analyse (injecteur, colonne et détecteur) diminuent significativement la sensibilité et la probabilité d'un faux positif augmente.

La méthode analytique développée pour le dosage des phytosanitaires et mise en œuvre dans nos travaux associe la technique QuEChERS et l'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse trappe d'ions (CPG/SM²). Elle permet un enrichissement suffisant en pesticides pour dépasser les limites de détection (LD) mais conduit aussi à une concentration importante en analytes matrice responsables d'interférences en particulier pour l'étude d'extraits concentrés d'épiderme de pommes.

Dans ce contexte, les effets matrice pouvant survenir lors de l'injection d'un extrait QuEChERS concentré de pommes (fruits, peau et chair) issues de trois variétés dans un chromatographe en phase gazeuse couplé à un détecteur de masse trappe d'ions ont été étudiés. Les analyses ont été ciblées sur 12 pesticides, dont le choix a été préalablement déterminé lors d'une étude cartographique des résidus de la récolte à l'assiette (« *from the farm to the fork* »), permettant ainsi de valider leur occurrence dans les trois variétés de pommes sur la saison 2012 (étude non présentée dans ce manuscrit). Les résultats sont présentés sous la forme d'un article intitulé « *Matrix-matching as an improvement of strategy for the detection of pesticide residues* » publié par *Journal of Food Science* (Vol. 81, N°5, 2016).

Afin de pouvoir s'affranchir de ces interférences et permettre des analyses de résidus dans la peau des pommes, une étude de la relation entre les effets matrice observés précédemment et la

composition de la matrice peau de pommes a permis de proposer une méthode de purification par chromatographie sur couche mince haute performance en complément de l'extraction par QuEChERS afin de minimiser les effets matrice. Cette étude fait l'objet d'un article intitulé « *Evaluation and prevention of negative matrix effect of terpenoids on pesticide in apples quantification by gas chromatography-tandem mass spectrometry* » publié par *Journal of Chromatography A* (Vol. 1483, 2017).

2. Matrix-matching as an improvement strategy for the detection of pesticide residues

Matrix-Matching as an Improvement Strategy for the Detection of Pesticide Residues

Géraldine Giacinti, Christine Raynaud, Sophie Capblancq, and Valérie Simon

Abstract: More than 90% of the pesticides residues in apples are located in the peel. We developed a gas chromatography/ion trap tandem mass spectrometry method for investigating all detectable residues in the peel of 3 apple varieties. Sample preparation is based on the use of the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe method on the whole fruit, the flesh, and the peel. Pesticide residues were quantified with solvent-matched and matrix-matched standards, by spiking apple sample extracts. Matrix effects dependent on the type of extract (fruit, flesh, or peel) and the apple variety were detected. The best data processing methods involved normalizing matrix effect rates by matrix-matched internal/external calibration. Boscalid, captan, chlorpyrifos, fludioxonil, and pyraclostrobin were the most frequently detected pesticides. However, their concentrations in the whole fruit were below European maximum residue levels. Despite negative matrix effects, the residues in peel were detected at concentrations up to 10 times higher than those in whole fruits. Consequently, other pesticide residues present at concentrations below the limit of quantification in the whole fruit were detected in the peel.

Keywords: apple, GC-MS/MS, matrix effects, pesticides, residues

Practical Application: The analytical method presented could be extended to the determination of pesticide residues in apple peel extracts, provided that matrix-matched calibration is used to compensate for the matrix effect.

MS 20151519 Submitted 9/7/2015, Accepted 3/12/2016. Authors Giacinti, Raynaud, Capblancq, and Simon are with Laboratoire de Chimie Agro-industrielle (LCA), Univ. de Toulouse, INRA, INPT, Toulouse, France. Direct inquiries to author Giacinti (E-mail: geraldine.giacinti@ensiacet.fr)

T. Toxicology &
Chemical Food Safety

T1342 Journal of Food Science • Vol. 81, Nr. 5, 2016

© 2016 Institute of Food Technologists®
doi: 10.1111/1750-3841.13296
Further reproduction without permission is prohibited

A Publication of
the Institute of Food Technologists
Journal of Food Science

2. 1. Introduction

Pesticides are of considerable importance in crop production, and are widely used to fight pests and diseases. However, their widespread use in large amounts has led to environmental contamination. Consumers are very concerned about the health risks associated with the presence of pesticide residues in their food (Bro-Rasmussen 1996 [1]). Pesticide control has thus become an important issue for the food industry. European Directive 2009/128/CE (EC 2005 [2]) has drastically limited the amounts of pesticide residues permitted in fruits, with the aim of encouraging good agricultural practice and ensuring food safety.

Sensitive and robust analytical techniques are required to cover all the various chemical classes of pesticides with different physicochemical properties used. One common analytical approach is based on generic, low-selectivity sample preparation techniques combined with highly selective

instrumental analysis. The QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) procedure is a widely used generic sample preparation method for the extraction of pesticides from fruits, vegetables and crop products. It involves rapid extraction in acetonitrile, followed by a clean-up step based on dispersive-solid phase extraction (d-SPE) with a primary secondary amine (PSA) sorbent, C18 and/or GCB sorbents, plus anhydrous MgSO₄ for the elimination of water. Many applications have been successfully validated for a large number of pesticides in complex matrices: honey (Barganska *et al.* 2013 [3]), baby food (Georgakopoulos *et al.* 2011 [4]), milk (Jeong *et al.* 2012 [5]), rice (Hou *et al.* 2013 [6]), farming foodstuffs (Lesueur *et al.* 2008 [7]), fruit/vegetables (Lu *et al.* 2012 [8]), shrimps (Omar *et al.* 2013 [9]), and field soil (Zhang *et al.* 2012 [10]).

Pesticides are usually analyzed by liquid chromatography combined with mass spectrometry (Barganska *et al.* 2013 [3], Sinha *et al.* 2012 [11]), but they may also be analyzed by gas chromatography (GC) coupled to mass spectrometry (MS) or electron capture detection (ECD) (Furlani *et al.* 2011 [12], Balinova *et al.* 2007 [13]). Published quantitative MS applications have included the use of a single quadrupole or ion trap analyzer operating in selected ion-monitoring (SIM) mode (Abdulra'uf et Tan 2013 [14], Chen *et al.* 2011 [15], Cunha et Fernandes 2011 [16]), and more selective techniques, such as tandem mass spectrometry (MS/MS) with the use of an ion trap or triple quadrupole, with selected reaction monitoring (SRM) to improve both selectivity and sensitivity (Cherta *et al.* 2013 [17], Martins *et al.* 2012, Fillatre *et al.* 2011 [19]). Many studies have focused on the determination of pesticide residues in apples (Sinha *et al.* 2012 [11], Abdulra'uf et Tan 2013 [14], Cherta *et al.* 2013 [17], Cervera *et al.* 2010 [20], Cunha *et al.* 2009 [21], Stajnbaher et Zupancic-Kralj 2008 [22]), but the methods developed generally involved the optimization of multiresidue analyses for the study of a large number of pesticides rather than the simultaneous analysis of specific targeted pesticides as reported here. Previous studies have shown that the chromatographic response for pesticide residues may differ considerably between extract matrices (Poole 2007 [23]).

The aim of this study was, therefore, to develop a specific GC-MS/MS analytical method for the 10 target pesticides (boscalid, captan, chlorpyrifos-ethyl, dithianon, flonicamid, fludioxonil, pyraclostrobin, pirimicarb, thiacloprid, thiamethoxam) most frequently used to treat apples in the orchards of South-West France. Orchards may undergo more than ten phytochemical treatments during the growth cycle, up until harvest, not only to fight pests and diseases, but also to improve fruit preservation. Propargite, a molecule definitively banned in 2013, was also added to the list of compounds tested, to assess the potential persistence of this molecule.

2. 2. Materials and methods

2. 2. 1. Target apple varieties

a- Apple varieties

Three varieties of apples, referred to here as VAR1, VAR2, VAR3, were chosen from those most widely grown in France and most popular with consumers. These three varieties are harvested in different seasons, from the end of summer (early harvest) to the end of winter (late harvest), and are therefore subject to different pest risks. All the varieties were treated according to the seasonal pest risk and the sensitivity of the variety concerned: VAR1 is the most resistant of the three varieties, whereas VAR2 is more sensitive to pest stress. VAR3 is the most fragile and is often systematically treated. Experiments were carried out with apples that had been sprayed on the tree and collected

from the orchard in August (VAR1), October (VAR2) or November (VAR3). They were stored in a cold room until processing.

b- Surface characterization

Samples of fruit cuticle were examined using cryofixation and low-temperature scanning electron microscopy (SEM). Micrographs were obtained with a Quanta 250 FEG FEI microscope.

The contact angles of water droplets were measured on apple cuticles with a goniometer at room temperature (Digidrop, GBX).

2. 2. 2. Target pesticides

The choice of pesticides for this study was based on a number of factors, including the magnitude of pest risks, pesticide efficiency, the variety of fruit and its resistance, the harvest period and the persistence of the pesticide. Eleven pesticides were studied: the 10 most frequently used on the selected apple varieties and another molecule that was recently banned (Table III-1).

Commercial Name	Pesticides	CAS N°	Classification ¹	Use ²	Chemical formula	MW (g mol ⁻¹)	EU MRLs (µg g ⁻¹ fruit)	Log K _{ow}
BELLIS (BASF AGRO)	Boscalid	188425-85-6	Carboxamide F	c	C ₁₈ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O	343.21	2	2.96
BELLIS (BASF AGRO)	Pyraclostrobin	175013-18-0	Strobilurin F	c	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₃ O ₄	387.82	0.5	3.99
SIGMA DG (ARYSTA LIFESCIENCE)	Captan	133-06-2	Phthalimide F	f	C ₉ H ₈ Cl ₃ NO ₂ S	300.59	3	2.50
PYRINEX ME (MAKHTESHIM)	Chlorpyrifos Ethyl	39475-55-3	Organothiophosphate I, A, N	C	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	350.59	0.5	4.7
DELAN WG (BASF AGRO)	Dithianon	95591-89-2	Quinone F	f	C ₁₄ H ₄ N ₂ O ₂ S ₂	296.32	3	3.32
TEPPEKI (ISK BIOSCIENCES)	Fonicamid	158062-67-0	Pyridine I, a	a	C ₉ H ₆ F ₃ N ₃ O	229.16	0.2	-0.24
SAFIR (SYNGENTA)	Fludioxonil	131341-86-1	Phenylpyrrole F	c	C ₁₂ H ₆ F ₂ N ₂ O ₂	248.19	5	4.12
PIRIMOR G (SYNGENTA)	Pirimicarb	23103-98-2	Carbamate I, A	a	C ₁₁ H ₁₈ N ₄ O ₂	238.29	2	1.7
CALYPSO (BAYER)	Thiacloprid	111988-49-9	Neo-nicotinoid I, A, M	a	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ S	252.72	0.3	1.26
ACTARA (SYNGENTA)	Thiamethoxam	153719-23-4	Neo-nicotinoid I	I, w	C ₈ H ₁₀ ClN ₅ O ₃ S	291.71	0.5	-0.13
	Propargite	2312-35-8	Sulfite		C ₁₉ H ₂₆ O ₄ S	350.47	3	5.7

¹ A: acaricide; I: insecticide; N: nematocid; F: fungicide; a: aphicide; M: molluscicide

² c: conservation; f: against fleck; C: against codling moth; a: against aphids; w: against woolly apple aphids

Table III-1: Characteristics of target pesticides

2. 2. 3. Standards and reagents

Pesticide-grade ethyl acetate and acetonitrile were obtained from Sigma-Aldrich (France). The analytical standards used for boscalid (99.9%), captan (99.6%), chlorpyrifos-ethyl (99.9%), dithianon (97.4%), fonicamid (91.9%), fludioxonil (99.9%), pirimicarb (98.5%), propargite (99.5%),

pyraclostrobin (99.9%), thiacloprid (99.9%), thiamethoxam (99.7%), thiamethoxam-d3 ($\geq 98\%$), and tris(1,3-dichloro-2-propyl)phosphate (TDCPP) (96%) were the “Analytical Standard Pestanal” standards, as supplied by Sigma-Aldrich (Germany). The characteristics of the targeted compounds are summarized in Table 1. Thiamethoxam-d3 was used as an isotopically labeled injection internal standard (IL-IS) and tris(1,3-dichloro-2-propyl)phosphate (TDCPP) was used as a procedural internal standard (P-IS).

The QuEChERS (mixture of MgSO_4 , sodium chloride, disodium citrate and disodium hydrogen citrate; Q-Sep kit 26235), and a mixture of MgSO_4 , primary secondary amine (PSA) and C18 (tubes 26221 + 26125), was purchased from Restek (France).

2. 2. 4. Sample preparation

a- Sample preparation

Three composite samples of 2 kg of whole fruits were collected for each variety, and 1 kg of each was ground in a food processor. The other kilo was peeled, and the peel and the flesh were ground separately. The processed samples were then frozen and stored until extraction. Samples were identified as follows: FRUITVAR1, 2 or 3; FLESHVAR1, 2 or 3 and PEELVAR1, 2 or 3, for the fruit, flesh and peel extracts, respectively, of each apple variety.

b- Extraction and clean-up

A modified version of the QuEChERS method (based on AFNOR NF EN 15662 (AFNOR 2009 [24] and Anastassiades *et al.* 2003 [25]) was used to obtain pesticide extracts. Homogenized sample (10 g) was mixed with 550 ng P-IS in 10mL of acetonitrile and subjected to extraction with the QuEChERS Restek Q-Sep™ salts kit. The resulting supernatant was transferred to the Restek dSPE Q-Sep™ adsorbent kit. The entire purified supernatant was recovered and concentrated to dryness under a nitrogen stream. The dry extracts were dissolved in a final volume of 500 μL ethyl acetate supplemented with 1000 ng IL-IS and passed through a PTFE filter with 0.22 μm pores.

2. 2. 5. Preparation of standards and calibration curves

a- Preparation of solvent-matched standards

Stocks were prepared at a concentration of around 100 ng/ μL in ethyl acetate and frozen. Stock standard mixture solutions were prepared in 500 μL of ethyl acetate and contained 80 to 8000 ng of all target pesticides, 550 ng of P-IS and 1000 ng of IL-IS. Six-point calibration curves were obtained by plotting the analytes/internal standard ratio against the concentration of analytes.

These solutions were also used to optimize mass spectrometry detection.

b- Preparation of matrix-matched standards

Matrix-matched standards at eight concentration levels were prepared by spiking apple sample extracts from each variety. Apple sample extracts were prepared as described in the sample preparation paragraph, except that P-IS was introduced with the stock standard mixture solutions of the target pesticides and IL-IS was introduced during dry extract recovery. The concentrations of the

standards were the same as those for the solvent-matched standards. The final solutions were passed through a PTFE filter with 0.22 µm pores.

2. 2. 6. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

Analyses were performed in an UltraTRACE gas chromatograph with a split/splitless injector, coupled to an ITQ900 ion trap mass spectrometer (Thermo Scientific, Courtaboeuf France). The RXI-5Sil-MS column (30 m x 0.25 mm ID x 0.25 µm film thickness) (Restek, France) was heated as follows: 40°C (2 min), 220°C at 30°C/min, 260°C at 5°C/min, and 280°C (5 min) at 20°C/min. Helium (99.999%) was used as the carrier gas, at a flow rate of 1 mL/min, and as the collision gas in the ion trap chamber. The mass spectrometer was operated in electron impact mode (70 eV). The sample (1 µL) was injected into the machine in the splitless mode (0.75 min) at 300°C. Data were acquired with Excalibur software.

Pesticide spectra were acquired in the full-scan mode. MS/MS conditions were optimized to achieve a good signal-to-noise ratio for MS/MS detection. Each compound was quantified on the basis of total ion count, from two to four fragment ions, after fragmentation of the selected precursor by collision-induced dissociation (CID). The precursor ions were chosen on the basis of the MS spectra and published data. Five excitation voltages were studied (0.5, 1, 1.5, 2 and 3 V) for each pesticide and its precursor ion. The optimum values were selected by plotting CID voltages against the precursor and its fragment ion areas in the case of solvent-matched standard solutions, with confirmation on apple matrices.

2. 2. 7. Validation parameters and quality control

The extraction and analytical methods were carried out in accordance with AFNOR NF EN 15662 (AFNOR 2009 [24]). The limit of quantification (LOQ), defined as the concentration corresponding to a signal-to-noise ratio of 10, was estimated from the chromatogram for the matrix-matched standards at the lowest calibration level used, for each compound. The limit of detection (LOD) was defined as LOQ/2. Linearity was studied with six matrix-matched standards. Recovery and reproducibility were determined at two levels of fortification (40 ng/g and 200 ng/g - 10 replicates each), by adding known quantities of pesticide standard solution to 10 g of homogenized peel.

The relationship between the calibration curve slopes obtained in solvent (S_s) and in matrix (S_m) provide information about the matrix effect (% ME) (Kwon *et al.* 2012 [26], Andrade *et al.* 2011 [27]):

$$\%ME = \frac{S_m}{S_s} * 100 \quad (1)$$

2. 2. 8. Statistical analysis

ME data were subjected to analysis of variance (ANOVA), principal component analysis (PCA) and factorial discriminant analysis (FDA) (XLSTAT 2015, 2.01, Addinsoft, Paris, France). PCA (6 x 9 matrices) was performed on the mean values for extracts and pesticide replicates, to describe the variation of the ME calculated with (Eq. 1). FDA (9 x 6 matrices) was performed on the ME for all

pesticides, between apple extracts, on the basis of apple variety and extract origin. A final FDA (18 x 9 matrix) was performed on ME, to study and validate the ME data processing methods.

2. 3. Results and discussion

2. 3. 1. Selection of MS-MS condistions

The total ion chromatogram (TIC) of the 11 pesticides is shown in Figure III-1. Captan was degraded by hot splitless injection into tetrahydrophthalimide (THPI) (Banerjee *et al.* 2013 [28]).

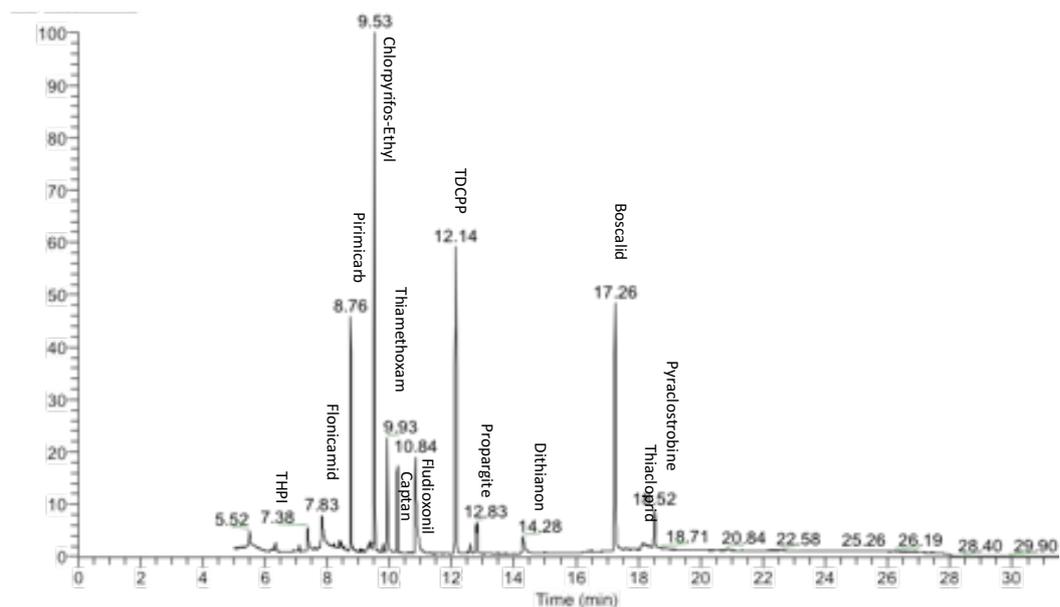


Figure III-1: Representative chromatogram of the 11 pesticides, isotopically labeled injection internal standard (IL-IS) and (TDCPP ; 0.01 g/L in ethyl acetate) as procedural internal standard (P-IS) in scan mode

For each target pesticide, the optimized CID voltage is presented in Table III-2.

Name	t_R (min)	MS/MS quantification (m/z)			MS/MS confirmation		
		Precursor ion (m/z)	Product ions (m/z)	Excitation voltage (V)	Precursor ion (m/z)	Product ions (m/z)	Excitation voltage (V)
Boscalid	17.25	139.9	76, 112, 140	1	341.8	TIC: 170 to 346	1.25
Captan	10.25	79	51, 79	1	148.9	TIC: 74 to 151	1.25
Chlorpyrifos-Et	9.52	313.65	258, 286, 314	1	285.7	TIC: 142 to 290	1
Dithianon	14.41	207.86	137, 164, 181 192, 208	1.35	263.8	TIC: 131 and 266	1.25
Flonicamid	7.83	173.8	126, 146, 174	1	145.9	TIC: 72 to 150	1.25
Fludioxonil	10.84	181.9	127, 154, 182	1.15	248	TIC: 123 to 250	1.25
Pirimicarb	8.77	166	96, 123, 137, 166	1.25	237.8	TIC: 118 to 240	1.25
Propargite	12.82	135	77, 95, 107, 135	1	349.8	TIC: 174 to 355	1
Pyraclostrobin	18.51	131.9	77, 104, 132	1	163.9	TIC: 81 to 166	0.8
Thiacloprid	18.15	250.85	165, 191, 224, 251	1.15	101	TIC: 50 to 102	1
Thiamethoxam	9.90	211.8	182, 212	1.20	246.8	TIC: 123 to 250	1
Thiamethoxam-d3	9.90	215.1	185, 215	1	185.1	TIC: 92 to 190	1.1
TDCPP	12.13	380.5	159, 271, 367, 381	1.1	268.7	TIC: 89 to 271	1

Table III-2: Retention times (t_R) and MS/MS conditions

2. 3. 2. Calibration and impact of variety on matrix effects, evaluated for fruit, flesh and peel

Four calibration curves were obtained for each pesticide, for each apple variety in solvent and in real matrices (Figure III-2). Experiments were conducted without analyte protectants to evaluate the real

ME according to (Eq. 1). GC hot splitless injection is commonly used for the quantitative analysis of trace amounts (Hajslova et Zrostlikova 2003 [29]). Unfortunately, ME can affect quantification accuracy, decrease method ruggedness, lower analyte detectability and may even result in false-positive or false-negative results. This effect may be canceled out if all active sites in the inlet and column likely to lead to analyte adsorption can be avoided. However, as this is difficult to achieve, several strategies for minimizing ME have been suggested, such as the use of analyte protectants (Wang *et al.* 2011 [30]) and matrix-matched calibration.

For ME values of more than 100, the matrix enhances the signal, leading to an overestimation of pesticide concentrations reflecting the adsorption of co-extracted matrix components in the inlet and column. For ME values under 100, the matrix decreases the signal, leading to an underestimation of pesticide concentrations reflecting analyte adsorption onto the active sites of the inlet, column and/or detector. Analyte responses may also be decreased if non-volatile matrix components accumulate in the insert liner and/or the column (De Sousa *et al.* 2012 [31]).

Kwon *et al.* in 2012 [26] showed that the normalization of analyte responses against internal standards decreased the variability of ME for all 38 pesticides they studied by GC, in 20 apple matrices. Moreover, the ME values obtained were all about $\pm 20\%$. These low values led the authors to question whether matrix-matched calibration was worthwhile. However, it should be borne in mind that the injections in this study were made in the presence of analyte protectants (ethyl glycerol, gulonolactone, D-sorbitol and shikimic acid). These protectants are known to work well in GC analysis, and they may have had a non-negligible effect on the pesticide peak areas.

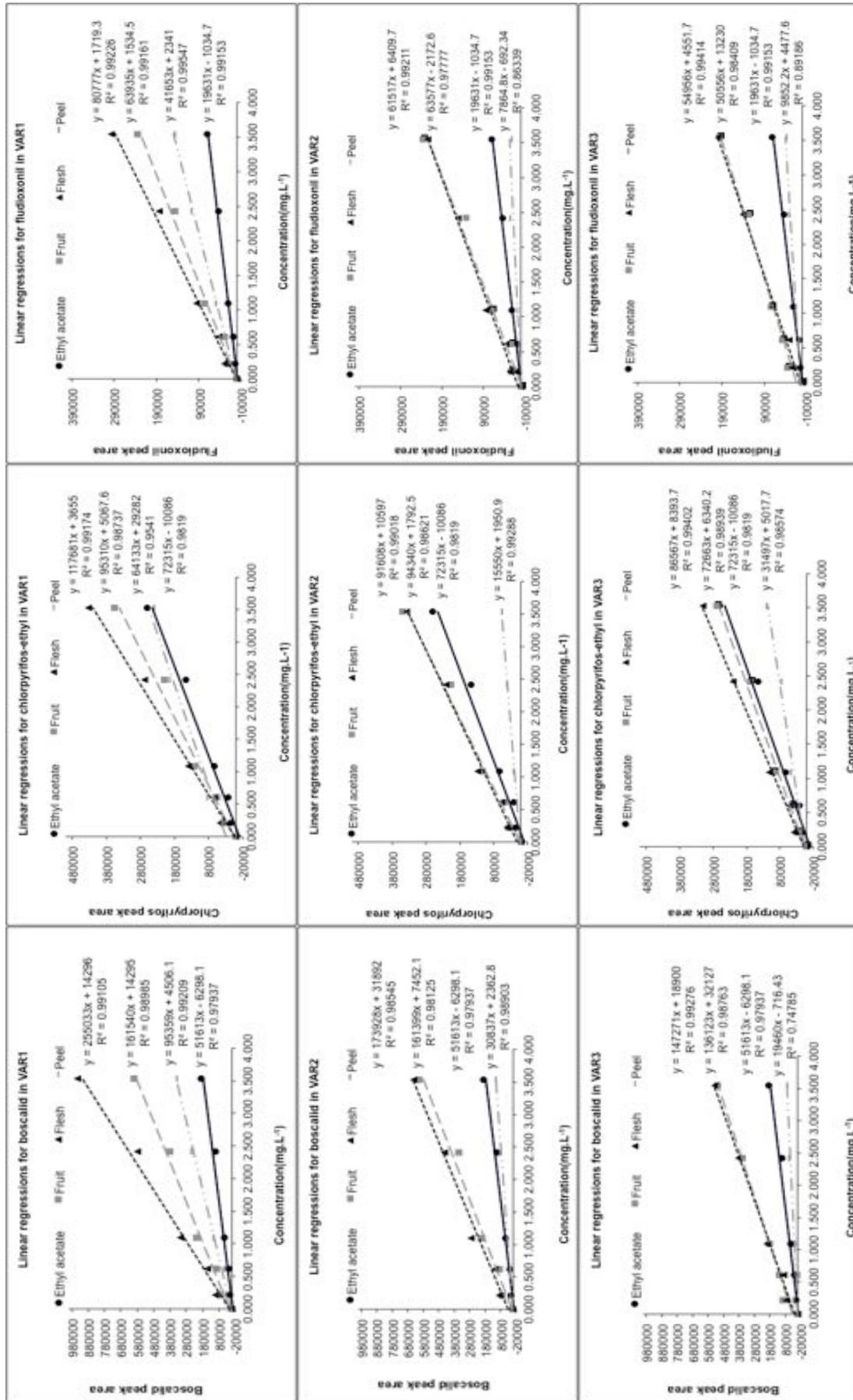


Figure III-2: Example of calibration curves for solvent-matched and matrix-matched standards

In this study, ME was evaluated for flonicamid, chlorpyrifos, boscalid, fludioxonil, pirimicarb and propargite in the various apple samples, with and without peak normalization. The trends for ME without normalization depended on both the extract (flesh, whole-fruit or peel) and variety (Figure III-3). Regardless of the pesticide considered, as previously reported by Kwon *et al.* in 2012 [26], the normalization of peak areas against IS peak areas smoothed the GC response of the six pesticides. Moreover, ME values were much lower after normalization for fruit and flesh extracts, whereas normalization had a much weaker effect for peel extracts. Indeed, ANOVA on ME data showed that normalization decreased the number of apple extracts considered to induce a significant ME for the six pesticides: *i.e.* total extracts ($p \leq 0.05$) for non-normalized data and only PEELVAR3 ($p = 0.049$) and PEELVAR2 ($p = 0.026$) for P-IS- and IL-IS-normalized data respectively. Anyway, the ME values obtained here in the absence of analyte protectants, were much larger than those calculated by Kwon and others (2012): between - 72% and 180%, rather than $\pm 20\%$.

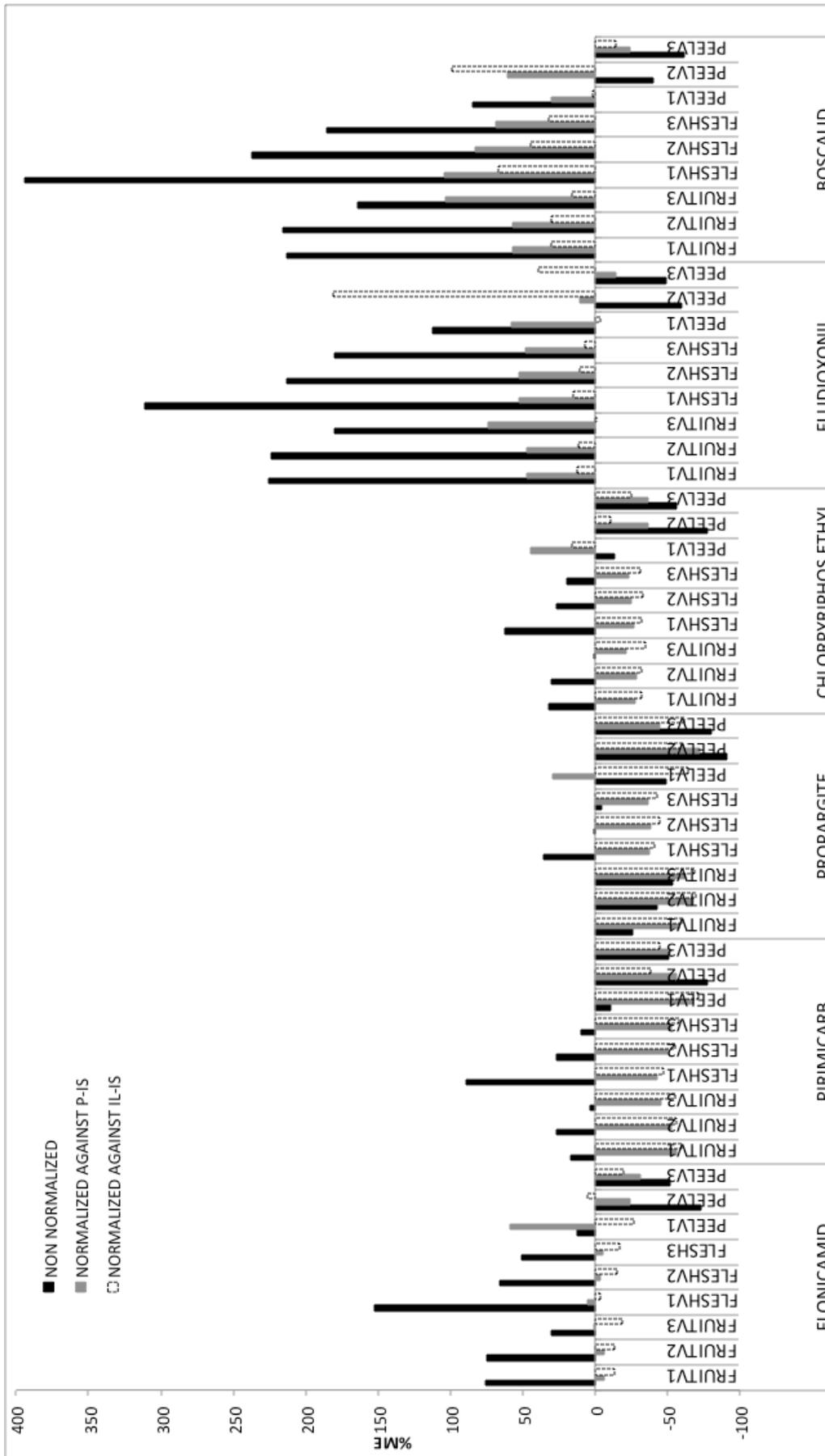


Figure III-3: ME calculated with and without normalization against internal standards

The score and loading plots of the PCA model for the ME data highlighted three clusters of pesticides (Figure III-4) displaying three different types of behavior in terms of ME. In all data treatments, fludioxonil and boscalid seemed to behave similarly, but their behavior was different from that of propargite and pirimicarb, which behaved similarly to each other. This difference may reflect the presence (fludioxonil and boscalid) or absence (propargite and pirimicarb) of halogens in the molecule (Table III-1).

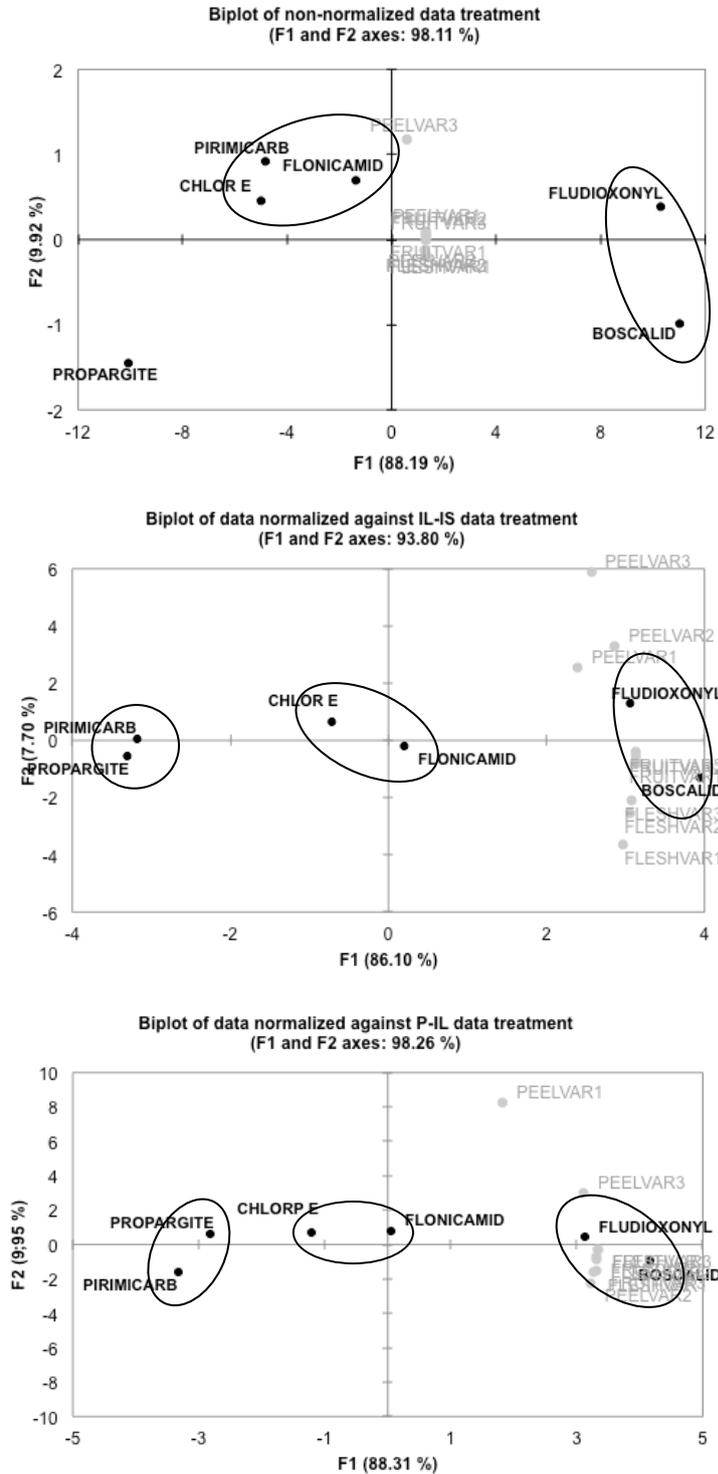


Figure III-4: Loading and score plots for the first two principal components (F1 and F2) of the PCA models for ME evaluations. F1 and F2 explained (a) 98.11%, (b) 98.26% and (c) 93.80% of the variation in the dataset

The FDAs based on the origin of the extract (peel, flesh and whole fruit) were performed to explain the variation of ME and to determine the impact of the type of extract on ME. All apple extracts were correctly classified in all FDAs.

The results for non-normalized data showed that apple flesh extracts gave the strongest matrix effect (Figure III-5). Indeed, the ME values obtained for fludioxonil and boscalid with flesh extracts were 200 to 400%, whereas the ME values obtained for whole-fruit extracts were only 150 to 200%. For the other pesticides, ME values were below 150% for flesh extracts and 75% for whole-fruit extracts (Figure III-3). Moreover, the FDA based on VAR1, VAR2 and VAR3 for non-normalized data showed that ME did not depend on variety.

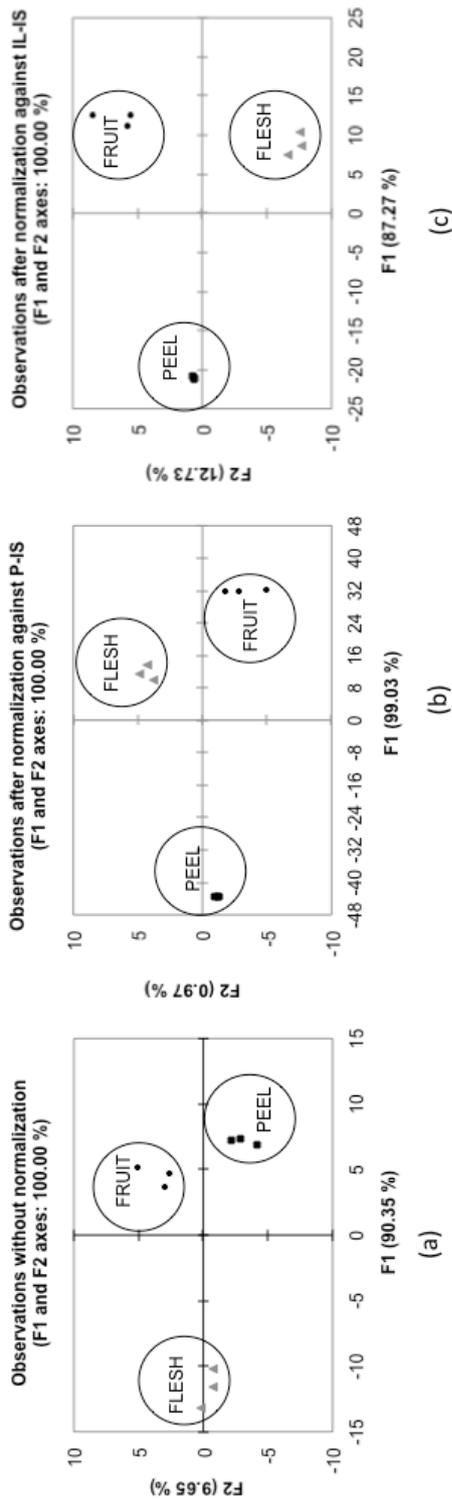


Figure III-5: FDA of ME data for six pesticides, between apple extracts, according to the origin of the extract (peel, flesh and fruit)

(a) Non-normalized ME data: 90.35% of the total variance is explained by F1, and F1 is significantly discriminant between extracts ($P = 0.015$), whereas F2 is not ($p > 0.05$).

(b) ME data normalized against P-IS: 99% of the total variance of the data after normalization against P-IS is explained by F1, and F1 is significantly discriminant between extracts ($P = 0.000$), whereas F2 is not ($p > 0.05$).

(c) ME data normalized against IL-IS: 87.27% of the total variance of the data after normalization against IL-IS is explained by F1, and F1 and F2 are significantly discriminant, $P = 0.001$ and $P = 0.018$, respectively

Whatever the normalization method used, the difference between peel extracts and flesh and the fruit extracts was more significant than that between flesh and fruit extracts.

Normalization against P-IS was compared with normalization against IL-IS, by considering three groups defined on the basis of ME data processing methods (non-normalized, normalized against P-IS and normalized against IL-IS). The normalized ME values were correlated with PEELVAR2 and PEELVAR3, which were significantly discriminant for data normalized against IL-IS and P-IS, respectively (ANOVA). The ME values obtained without normalization differed significantly from those obtained after normalization, but the results obtained indicated that the two normalization methods did not differ significantly in their ability to reduce the matrix effect (Figure III-6). Thus, P-IS or IL-IS are equally useful for the normalization of results for the GC method described here.

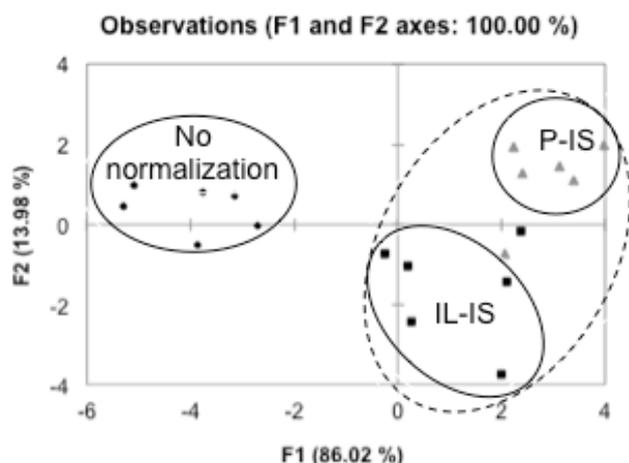


Figure III-6: Observation plot of FDA on ME based on ME data processing methods. F1 was significantly discriminant ($p = 0.005$) whereas F2 was not ($p > 0.05$)

Only a few studies have investigated the correlation between ME and the nature of the co-injected/extracted analytes (De Sousa *et al.* 2012 [31], Kowalski *et al.* 2013 [32]). The flesh and the whole fruit contain monosaccharides, such as fructose and glucose, together with sucrose and sorbitol, which is used as an analyte protectant (Wang *et al.* 2011 [30], Colin-Henrion 2008 [33]). Triterpenoids have been identified as major components of the cuticular waxes in apple peel (Szakiel *et al.* 2012 [34]). Preliminary studies to identify the analytes co-extracted with pesticides by QuEChERS demonstrated the presence of relevant concentrations of triterpenoids in peel extracts. These molecules were poorly or even not detected in fruit or flesh extracts. They may have been responsible for the negative ME values obtained in these experiments.

Variety was expected to affect the ME. VAR1, which is an early variety, should have a chemical composition different from that of later varieties, particularly as concerns its cuticular waxes. This variety benefits from strong sunlight, favoring the accumulation of large concentrations of sugar and water loss. These factors have an effect on the chemical synthesis of waxes. Structural differences were observed between the three apple varieties, in terms of color and epicuticular wax crystallization (Figure III-7 (a)). The outer crystal forms protect the fruits against biotic and abiotic stresses.

The cuticle of VAR1 contains epicuticular waxes crystallized as platelets perpendicular to the surface. The wax platelets from VAR2 are parallel to the surface, with some forming tubules. For VAR3, the

platelets of crystal waxes are embedded in a smooth continuous film of wax. These different structures result in differences in surface properties, such as wetting: contact angles vary from 80.8° to 104.5° (Figure III-7 (b)). VAR1 apples have a more hydrophobic surface than VAR2 and VAR3 apples. The surface of VAR3 apples is the most wettable.

Until 2000, it was taken for granted that the crystalline structure of waxes was correlated with their chemical composition (Belding *et al.* 1998 [35]). However, Riedel *et al.* in 2003 and 2007 [36,37] demonstrated that crystal formation resulted from a spontaneous phase separation of one highly concentrated constituent from a blend of amorphous waxes.

As a result, differences in metabolism lead to the co-extraction of different analytes (or at least different concentrations of analytes) and to different ME values. Further studies of this aspect are currently underway.

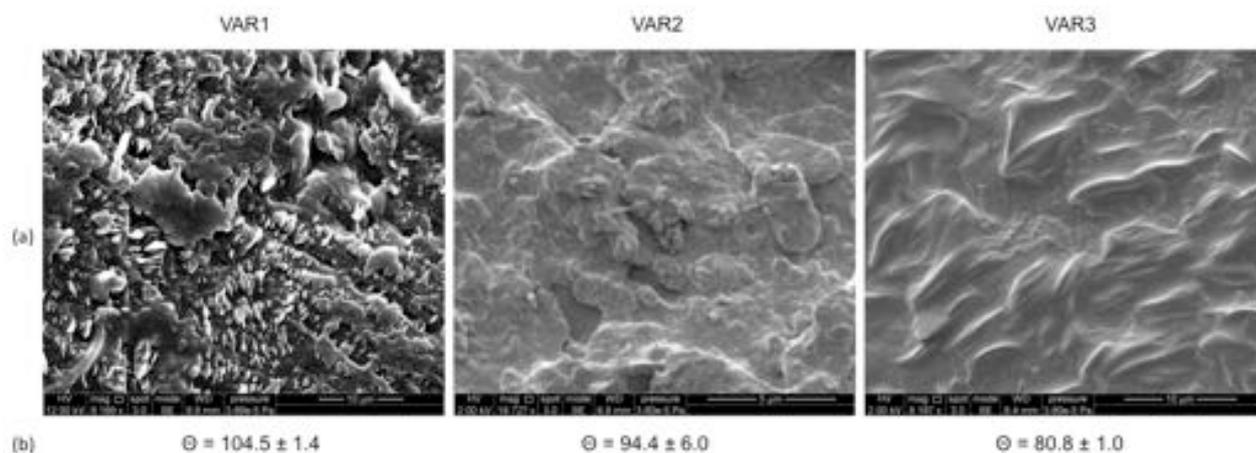


Figure III-7: Characterization of the surface of the three apples

(a) Cryo-SEM micrographs of the apple surface

(b) Mean contact angle measurements of water droplets on apple cuticles (at 25°C) (goniometer: Digidrop, GBX) (n = 10)

2. 3. 3. Method validation for apple peel

The **analytical response was linear** across the range studied, with correlation coefficients exceeding 0.98 for all pesticide residues. The calibration data (equation and regression coefficients) for boscalid, chlorpyrifos and fludioxonil are shown, as an example, in Figure III-2.

The **limit of quantification (LOQ)** was about 0.01 mg/kg for all the compounds studied, and this value is compatible with the requirements of EU legislation concerning the levels of these pesticides permissible in apples (Table III-1).

Mean recovery rates of between 71.1 and 119.6% were achieved, with RSDs between 4.1 and 15.1% for all pesticides except dithianon, thiamethoxam and thiacloprid. These compounds are not easy to analyze by gas chromatography, and liquid chromatography is therefore generally preferred. These results provide evidence that the optimized method achieves acceptable recovery rates, in line with EU guideline criteria (SANCO/12571/2013) (EC 2015 [38]). A practical default range of 70-120% with a RSD < 20% may be used for individual recoveries in routine multiresidue analysis.

2. 3. 4. Analysis of apple samples at harvest

The above method was applied to the analysis of the eight validated pesticides in the three varieties of apple just after harvest; we analyzed both the whole fruit and the peel.

The concentrations of the detected pesticides in fruits ranged from 0.003 to 0.2 mg/kg (Figure III-8 (a)). Captan, chlorpyrifos and flonicamid levels were the highest detected in VAR1, as this variety was sprayed with these chemicals a few weeks before the harvest. For VAR2, fludioxonil was the most abundant pesticide. This variety is harvested later than VAR1 and must be sprayed with agents to improve fruit preservation just before harvest (Table III-1). VAR3 is also a late variety, and it is also highly sensitive. This variety was therefore treated with large amounts of preservation treatments. The most abundant pesticides detected in the fruit were fludioxonil, boscalid and pyraclostrobin (Table III-1). Captan was also abundant in VAR3. Residues of propargite and pirimicarb were present at concentrations below the detection limit in whole fruits of all three varieties. They were therefore not detected in the fruit. The occurrence of pesticide residues in the three varieties was highly dependent on the treatments used before harvest: all three varieties were treated with SIGMA DG (captan). Only VAR1 was treated with PYRINEX ME (chlorpyrifos-ethyl) and TEPPEKI (flonicamid). VAR2 was sprayed with SAFIR (fludioxonil), as was VAR3, which also received a second fruit-preserving treatment in the form of BELLIS (pyraclostrobin + boscalid). In all cases, pesticide residues in the fruit were below the MRL (Table III-1).

Pesticide concentrations were higher in the peel than in the whole fruit, at 0.008 to 0.58 mg/kg (Figure III-8 (b)). Sprayed treatments tend to concentrate on the surface of fruits, so they are generally present at concentrations largely above the LOQ of the analytical method, and are therefore easier to detect in peel. The matrix effects observed for peel extracts were generally weak, but globally negative. The concentrations of the six pesticides detected were up to 10 times higher in the peel than in the fruit, and some exceeded 0.3 mg/kg (fludioxonil and boscalid in VAR2 and VAR3). These analyses revealed concentration ratios of between less than 100% and 900% between the two approaches, and they demonstrated the presence of pesticides in the peel that were not detected in the whole fruit because their concentrations were below the LOQ.

Indeed, in VAR1, the peel contained residues of boscalid and pyraclostrobin, in addition to pirimicarb. The peel of VAR2 contained traces of boscalid and pyraclostrobin, flonicamid, chlorpyrifos and propargite. The peel of VAR3 contained only the pesticides used for its protection (captan, fludioxonil, boscalid and pyraclostrobin).

Based on the cropping schedules for the three varieties considered, the traces of residues other than those used to treat the orchard concerned may originate from cross-contamination between the three orchards or from other crops close to them. The occurrence of propargite, the sale of which has been banned since December 2011, with its use definitively prohibited since 2013, may be explained by the persistence of this molecule. Contamination may also occur from the soil and/or manipulations during harvesting.

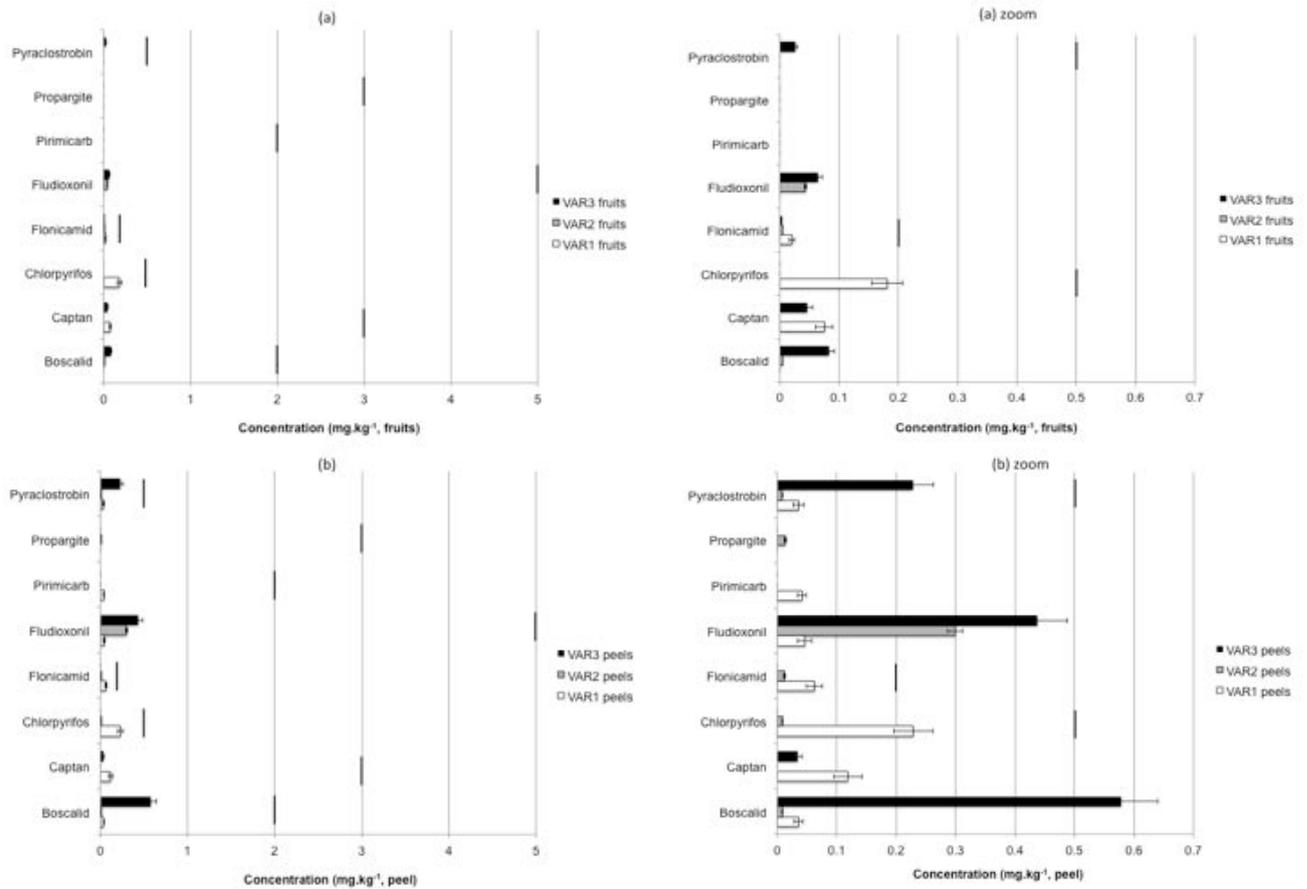


Figure III-8: Overview of pesticide residues in harvest apples calculated for the three varieties, for the whole fruit (a) and the peel (b) ($|EU-MRLs$)

2. 4. Conclusions

A multi-residue method for determining pesticide residues in apples was developed and shown to yield satisfactory results. This method is based on the use of the QuEChERS method coupled to GC-(ITQ) MS/MS. Tandem mass spectrometry is a powerful tool for the identification of pesticide residues, and for analyses in complex matrices, because it facilitates the differentiation of target pesticides from co-extracted compounds that might interfere with traces of these pesticides. Nevertheless, matrix interference cannot be totally eliminated by the high specificity of GC-MS² for some matrix-transition combinations, potentially leading to the over- or underestimation of concentrations.

Matrix effects were largely positive for fruit and flesh extracts but negative for peel extracts. Variety had no influence on the matrix effect in fruit and flesh extracts. However, in peel extracts, variety affected the ME, with a tendency towards positive or less negative values, depending on the pesticide, in VAR1. The nature and concentration of the co-extracted analytes in peels from the three varieties may account for these differences. Investigations are currently underway to improve our understanding of the role of co-extracted analytes in matrix effects for the same analytical configuration. This investigation could lead to the optimization of purification steps before the analysis of concentrated peel extracts to minimize negative ME. Normalization of the analytical responses of the pesticides to internal standards tended to reduce matrix effects and to minimize

their variability between pesticides. However, these effects remained high in peel extracts in the absence of analyte protectants.

Working with the whole fruit matrix is an important approach, as yields concentrations that can be compared with MRLs. In this study, boscalid, captan, chlorpyrifos, fludioxonil and pyraclostrobin were the most frequently used and, thus, also the most frequently detected pesticides. Their concentrations in whole fruit remained below the maximum residue levels. Analyses of the peel matrix can reveal all the pesticides present on the surface, thanks to the concentration effect from fruit to peel, resulting in concentrations in the peel being more likely to exceed the LOQ. Matrix-matched calibration is a practical and reasonably effective approach that can be used to compensate for matrix effects in GC-MS methods for pesticide residue analysis.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was undertaken within the framework of a FUI project, INNOPOM, funded by BPI France and the *Conseil Régional Midi-Pyrénées*.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

G. Giacinti, S. Capblancq, C. Raynaud and V. Simon designed the study, collected data, interpreted the results and drafted the manuscript.

Appendix. Supplementary data

Optimization of MS/MS detection

The Total Ion Chromatogram (TIC) of the eleven pesticides is shown in Figure 1. Captan is degraded by hot splitless injection into Tetrahydrophthalimide (THPI) (Banerjee *et al.* 2013 [28]).

In ion trap detectors, an ion of interest is isolated and then produces characteristic ions by collision induced dissociation (CID). The optimum CID voltage must be determined for each parent ion of the target compounds. Parent ions were selected according to the mass spectrum obtained in Scan mode for each pesticide (Figure III-1). The limit of detection achieved in MS-MS depends on a number of factors such as intensity of the precursor ion, CID efficiency, fragmentation efficiency, and collection efficiency. Thus for the 4 major ions from the TIC, including when it exists the molecular ion of each pesticide, 0.5, 1, 1.5, 2 and 3 (V) CID voltages were applied, and the influence of CID voltage on parent and product ion abundance studied.

The parent ion for the quantitation was chosen on the basis of two criteria: the most abundant ion from the TIC and/or the most efficient transition parent-daughters. The parent ion for the MS/MS confirmation was chosen as closed as possible to the molecular ion when it was sufficiently abundant or among other most representative and sufficiently abundant ions from the TIC. The most important criterion is to get the most specific information for each pesticide (molecular ion, great number of daughters, specific ions).

Figure A.1 shows examples of the area curves for boscalid and flonicamid at different voltages. The precursor ion was the most abundant ion. When the voltage increases, the precursor ion is almost

totally fragmented and the product ions increase. However, for CID voltages that are too high, the product ion intensity is severely reduced.

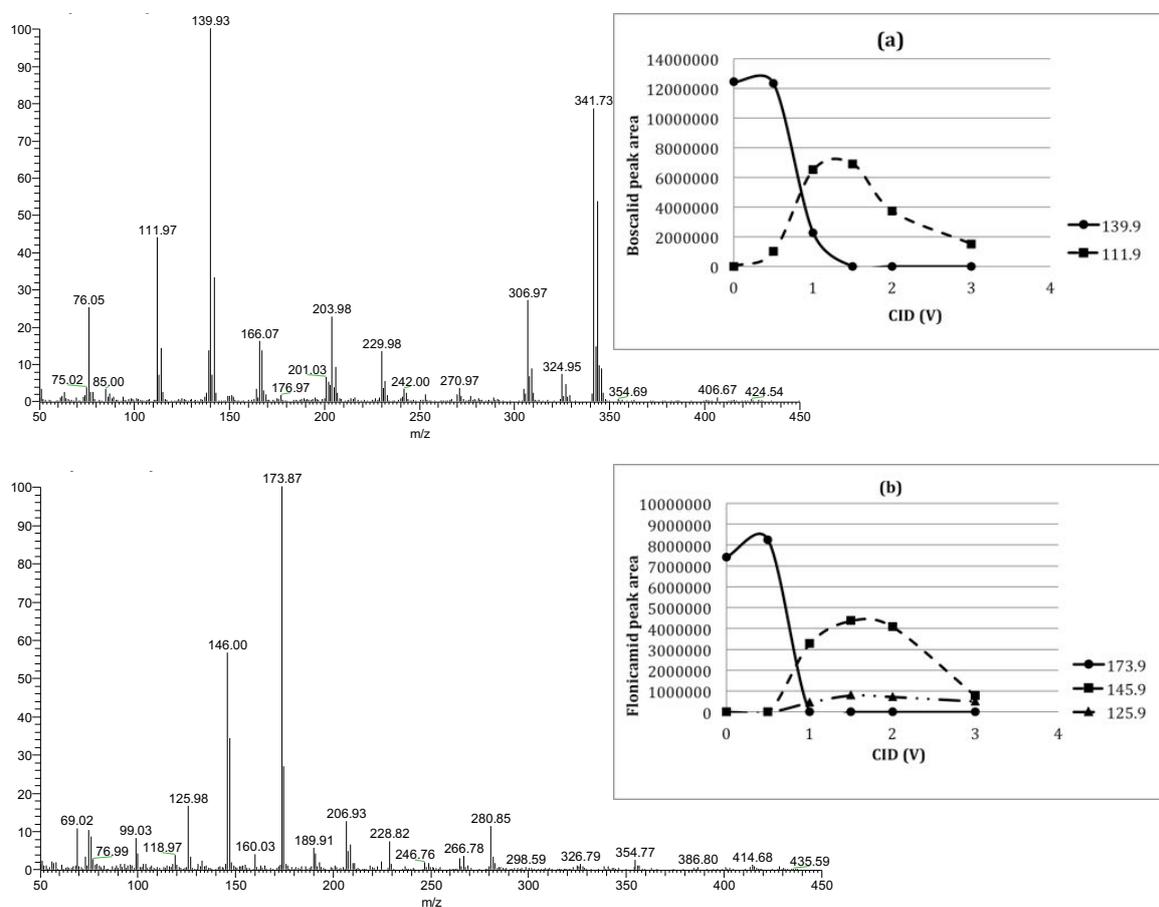


Figure A.1: TIC spectrum and influence of CID voltage on progeny ion area for (a) boscalid ($m/z = 139.9$) and (b) flonicamid ($m/z = 173.8$)

With 1.5 V, the product ions are the most abundant ions for chlorpyrifos and fludioxonil, and the parent ions are totally fragmented (Figure A.2). An increase in the voltage for chlorpyrifos, leads to a decrease of $m/z = 313.6$ to the benefit of at first $m/z = 285.7$, and then $m/z = 257.7$. Hence to obtain a maximum area of product ions, the optimum value is 1 V.

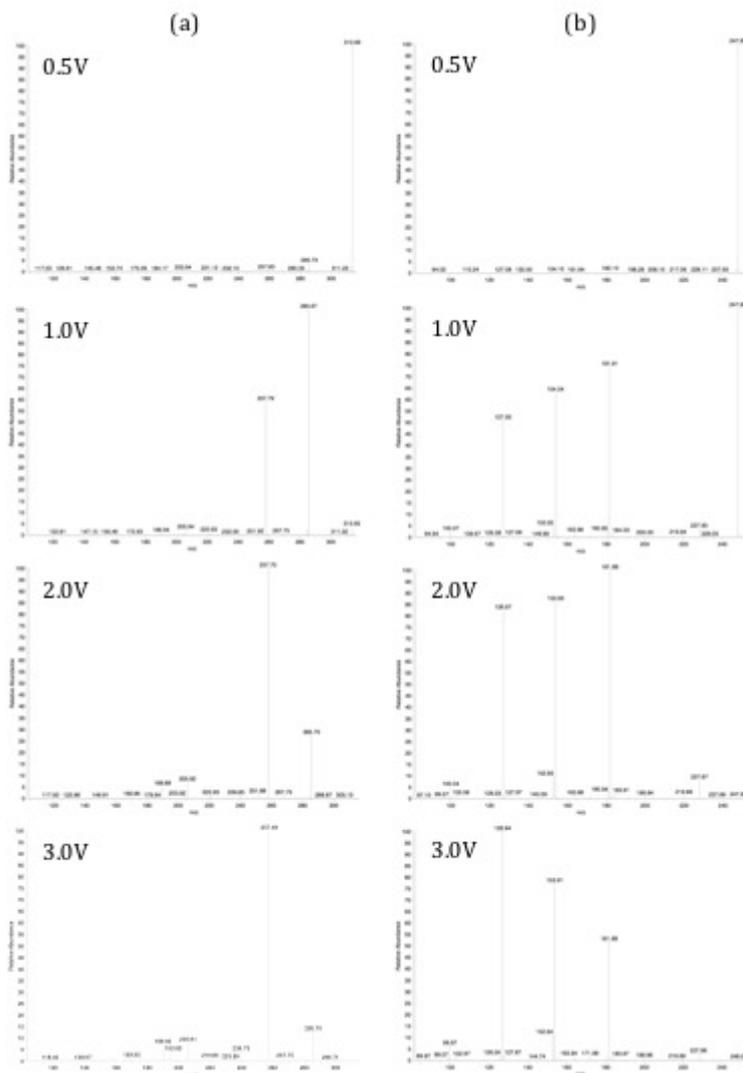


Figure A.2: Spectra for (a) Chlorpyrifos and (b) Fludioxonil at 0.5, 1, 2 and 3V applied voltages.

For boscalid, captan, flonicamid, propargite, pyrachlostrobin and thiamethoxam-d3, the voltage that provides a higher area of progeny ions is 1 V, but for TDCPP, thiacloprid and fludioxonil, thiamethoxam, pirimicarb and dithianon, voltages are between 1.1 and 1.35 V (Table III-2). These results were confirmed within apple matrices.

3. Evaluation and prevention of the negative matrix effect of terpenoids on pesticide in apples quantification by gas chromatography-tandem mass spectrometry

Journal of Chromatography A, 1483 (2017) 8–19



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma



Evaluation and prevention of the negative matrix effect of terpenoids on pesticides in apples quantification by gas chromatography–tandem mass spectrometry



Géraldine Giacinti*, Christine Raynaud, Sophie Capblancq, Valérie Simon

Laboratoire de Chimie Agro-industrielle (LCA), Université de Toulouse, INRA, INPT, Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 September 2016
Received in revised form
16 December 2016
Accepted 19 December 2016
Available online 21 December 2016

Keywords:

Apples
Pesticides
Oleanolic acid
Matrix effect
GC/MS²
HPTLC

ABSTRACT

The sample matrix can enhance the gas chromatography signal of pesticide residues relative to that obtained with the same concentration of pesticide in solvent. This paper is related to negative matrix effects observed in coupled gas chromatography–mass spectrometry ion trap (GC/MS²) quantification of pesticides in concentrated extracts of apple peel prepared by the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) method. It is focused on the pesticides most frequently used on the apple varieties studied, throughout the crop cycle, right up to harvest, to combat pests and diseases and to improve fruit storage properties. Extracts from the fleshy receptacle (flesh), the epiderm (peel) and fruit of three apple varieties were studied by high-performance thin-layer chromatography hyphenated with UV–vis light detection (HPTLC/UV visible). The peel extracts had high concentrations of triterpenic acids (oleanolic and ursolic acids), reaching 25 mg kg⁻¹, whereas these compounds were not detected in the flesh extracts (<0.05 mg kg⁻¹). A significant relationship has been found between the levels of these molecules and negative matrix effects in GC/MS². The differences in the behavior of pesticides with respect to matrix effects can be accounted for by the physicochemical characteristics of the molecules (lone pairs, labile hydrogen, conjugation). The HPTLC/UV visible method developed here for the characterization of QuEChERS extracts acts as a complementary clean-up method, aimed to decrease the negative matrix effects of such extracts.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

HIGHLIGHTS

- Terpenic acid levels affect matrix effects in pesticide quantification by GC/MS².
- Interactions between pesticides and terpenic acids were investigated.
- The combination of QuEChERS and HPTLC is proposed for optimal clean-up.

KEYWORDS

Apples, pesticides, oleanolic acid, matrix effect, GC/MS², HPTLC

3. 1. Introduction

Gas or liquid chromatography techniques coupled with mass spectrometry (MS or MSⁿ) are among the most powerful analytical tools currently available for monitoring pesticide residues in food. The use of mass spectrometry, particularly MSⁿ, has considerably improved the selectivity and sensitivity of the analysis. However, such methods may underestimate or overestimate pesticide levels in complex samples, such as food products, due to matrix effects. Such effects may result in significant differences in the signals obtained for chromatographic standards prepared in solvent and standards prepared in the matrix (Poole 2007 [23], De Sousa *et al.* 2012 [31], Kowalski *et al.* 2013 [32], Matuszewski *et al.* 2003 [39], Hajslova and Cajka 2008 [40], Silvestro *et al.* 2013 [41], Giacinti *et al.* 2016 [42], Shah *et al.* 2000 [43]). The chromatographic signal is increased by positive matrix effects and decreased by negative matrix effects. These effects may result from the adsorption of analytes and matrix components in the injector, the detector and/or the chromatographic column (Hajslova et Zrostlikova 2003 [29]).

Analysts have long focused on modifications to sample purification procedures as a means of compensating for the matrix effect. The QuEChERS method (Anastassiades *et al.* 2003 [25]) has been successfully used and adapted for the extraction of pesticide residues from various types of food sample, including fruits, such as tomato, pear, apple, orange, lemon, guava, grape, avocado..., vegetables, such as cabbage, carrot, lettuce, cucumber, onion..., rice (Steiniger *et al.* 2009 [44]), cereal grains (Shelly and Perman 2010 [45]), liquids and beverages, such as fruit juice, olive oil, honey (Paradis 2012 [46])..., and processed products, such as potato chips, and crackers (Lesueur *et al.* 2008 [7], Wilkowska and Biziuk 2011 [47], Fenik *et al.* 2011 [48], Guedes *et al.* 2016 [49]). Alternative methods have been developed, based on the addition of internal labeled standards (Kwon *et al.* 2012 [26]), calibration in the matrix (Andrade *et al.* 2011 [27], Wang *et al.* 2011 [30]), the addition of analyte protectants (*e.g.* sorbitol, γ -lactone-gulonic acid) (Andrade *et al.* 2011 [27]), or calibration correction factors (Poole 2007 [23]). Calibration correction factors are added to both the standards and the samples. They interact strongly with the active sites of the system (silanols), thereby minimizing matrix effects (Kwon *et al.* 2012 [26], Wang *et al.* 2011 [30]). The gas chromatograph (loading of liners and precolumns) and the mass spectrometer (source cleaning) should undergo regular maintenance, to ensure that the sensitivity and reproducibility of the GC/MS method remain high (Wang *et al.* 2011 [30]).

The matrix compounds most likely to interfere with gas chromatography analysis are lipids (*e.g.* waxes, triglycerides, phospholipids), pigments (*e.g.* chlorophylls, carotenoids, melanoidins) and other molecules with a high molecular weight (*e.g.* resins) likely to dissolve in the solvents used to extract the analytes of interest (Hajslova and Zrostlikova 2003 [29]). A tailing off or fade-out of peaks of interest on chromatograms may be interpreted as a classical sign of a dirty detector. It must be noticed that tailing peaks can also occur when there is an interaction between the analyte and the stationary phase of the chromatographic column or because of unsuitable injection parameters (insert, injection speed, temperature, volumes...) (Grob 1993 [50]). Apples matrices consist of diverse components, including sugars, proteins, lipids (Colin-Henrion 2008 [33], Marlett and Vollendorf 1994 [51], Massiot *et al.* 1994 [52], Travers 2002 [53], Wu *et al.* 2007 [54], Campeanu *et al.* 2009 [55]), polyphenols (Travers 2002 [53], Verdu 2013 [56], Veberic *et al.* 2005 [57], Dugé de Bernonville 2009 [58]) triterpenic compounds, paraffins, and alcohols (Szakiel *et al.* 2012 [34], Bonnier 1963 [59], Fernandes *et al.* 1964 [60], Kolattukudi 1984 [61], Garrec *et al.* 1995 [62], Shepherd and Griffiths

2006 [63], Buscchaus and Jetter 2011 [64], Dong *et al.* 2012 [65], Bianchi 1995 [66], McGhie *et al.* 2011 [67]), which may interfere with the analysis and contribute to matrix effects.

Positive matrix effects are stronger for pesticide molecules with particular functional groups: organophosphates (-P=O), carbamates (-O-CO-NH-), hydroxy compounds (-OH), amino compounds (-NH-), imidazoles, benzimidazoles (-N=) and urea derivatives (-NH-CO-NH-) (Poole 2007 [23], Hajslova and Zrostlikova 2003 [29]). Hydrophobic, non-polar compounds, such as persistent organochlorine contaminants, are less affected by positive matrix effects because they are less strongly adsorbed onto the liner surface. Organophosphates (*e.g.* chlorpyrifos, pirimiphos), organochlorides (*e.g.*, dicofol, captan), pyrethroids (*e.g.* fenvalerate, deltamethrin), azoles (*e.g.* tebuconazole, triadimefon), carbamates (*e.g.* carbaryl, pirimicarb), dinitroaniline derivatives (*e.g.* fluazinam, procymidone, trifluraline), amides (*e.g.* alachlor, butachlor), phenoxyacetic acid derivatives (*e.g.* 2,4-D-butylate, haloxyfop) and other compounds, such as piperonyl butoxide, chinomethionate, flutolanil, fluoroglycofen-ethyl, nitrofen, and hexazinone, are also typically sensitive to positive matrix effects (Wang *et al.* 2011 [30]). Giacinti *et al.* [42] demonstrated in 2016 negative matrix effects for flonicamid, chlorpyrifos, boscalid, fludioxonil, pirimicarb, and propargite in QuEChERS extracts of apple peel. They also demonstrated positive matrix effects for these compounds in flesh and fruit extracts. The analysis of pesticide residues by GC/MS² in apple peel results in higher target-analyte concentrations, at levels above the limits of detection (LOD), and a greater transfer of matrix analytes to extracts than analyses of the whole fruit.

The aim of this study was to investigate the composition of various QuEChERS extracts of peel/flesh/fruit, using an HPTLC method to determine the principal molecular markers of the apple matrix soluble in acetonitrile (sugars: fructose, glucose and sucrose, triterpenic acids, uvaol, paraffins C27-C29, phloridzin, primary fatty alcohols and polyphenols), (*i*) to identify the matrix compounds potentially responsible for the negative matrix effects in GC/MS², observed for flonicamid, chlorpyrifos, boscalid, fludioxonil, pirimicarb and propargite in peel extracts (Giacinti *et al.* 2016 [42]), and (*ii*) to propose a purification method for highly concentrated extracts for the limitation of these matrix effects.

3. 2. Materials and methods

3. 2. 1. Target apple varieties

Three apple varieties (VARI) from among the most widely grown and popular in France were chosen for a previous study (Giacinti *et al.* 2016 [42]). These varieties differ in terms of fruit color, composition, sensitivity to pests and ripening times. They were grown in various biotic and abiotic conditions and all trees were sprayed with commercial pesticide preparations according to the seasonal pest risk and the sensitivity of the variety concerned. The apples were collected from the orchard in August (VAR1), October (VAR2), or November (VAR3) and stored in a cold room at 4°C until processing.

3. 2. 2. Selection of pesticides and matrix compounds

The matrix effects of six pesticides among the 11 selected by Giacinti *et al.* in 2016 [42] were studied in GC/MS² here (Table III-3). The matrix compounds likely to be present in the QuEChERS extracts of apples are also listed in Table III-3.

Molecule	CAS No.	Classification	Chemical formula	MW (g mol ⁻¹)	Log K _{ow} (1)	Boiling point (°C)
Boscalid	188425-85-6	Pesticide	C ₁₈ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O	343.21	2.96	519.6 (1)
Chlorpyrifos ethyl	39475-55-3	Pesticide	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	350.59	4.7	377.4 (1)
Flonicamid	158062-67-0	Pesticide	C ₉ H ₆ F ₃ N ₃ O	229.16	-0.24	381.4±52.0 (1)
Fludioxonil	131341-86-1	Pesticide	C ₁₂ H ₆ F ₂ N ₂ O ₂	248.19	4.12	382.6 (1)
Pirimicarb	23103-98-2	Pesticide	C ₁₁ H ₁₈ N ₄ O ₂	238.29	1.7	326.2 (1)
Propargite	2312-35-8	Pesticide	C ₁₉ H ₂₆ O ₄ S	350.47	5.7	441.8 (1)
Oleanolic acid	508-02-1	Triterpenic acid	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456.70	6.47 [68]	553.5 (exp) (1)
Ursolic acid	77-52-1	Triterpenic acid	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456.70	6.43 [68]	528.0 (1)
Uvaol	545-46-0	Triterpenic diol	C ₃₀ H ₅₀ O ₂	442.72	8.10	500.7 (1)
Chlorogenic acid	327-97-9	Polyphenol	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.31	-1.01	439.5 (2)
Phlorizin	60-81-1	Polyphenol	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₀	436.41	1.50	506.9 (2)
Fructose	57-48-7	Monosaccharide	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.16	-1.46	474.1 (2)
Glucose	50-99-7	Monosaccharide	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.16	-3.24 (exp)	477.4 (2)
Sucrose	57-50-1	Disaccharide	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342.30	-3.70 (exp)	683.3 (2)
Heptacosane	593-49-7	Paraffins	C ₂₇ H ₅₆	380.73	13.60	416.4 (2)
Nonacosane	630-03-5	Paraffins	C ₂₉ H ₆₀	408.73	14.58	442.2 (2)
1-hexadecanol	36653-82-4	Fatty alcohol	C ₁₆ H ₃₄ O	242.44	6.73	322.5 (2)
1-octadecanol	112-92-5	Fatty alcohol	C ₁₈ H ₃₈ O	270.49	7.72	343.1 (2)
1-eicosanol	629-96-9	Fatty alcohol	C ₂₀ H ₄₂ O	298.55	8.70	370.4 (2)
1-docosanol	661-19-8	Fatty alcohol	C ₂₂ H ₄₆ O	326.60	9.68	386.7 (2)
1-tetracosanol	506-51-4	Fatty alcohol	C ₂₄ H ₅₀ O	354.65	10.66	412.8 (2)
1-hexacosanol	506-52-5	Fatty alcohol	C ₂₆ H ₅₄ O	382.71	11.65	425.7 (2)
1-octacosanol	557-61-9	Fatty alcohol	C ₂₈ H ₅₈ O	410.76	12.63	451.3 (2)
1-triacontanol	593-50-0	Fatty alcohol	C ₃₀ H ₆₂ O	438.81	13.61	461.4 (2)

(1) chemspider.com (estimé sur KOWWIN v1.67)

(2) calculated from smiles codes in HSPiP 4th edition v4.1.07

Table III-3: Pesticides and matrix compounds studied

3. 2. 3. Chemicals and materials

Chromasolv® for HPLC solvents were purchased from Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France): ethyl acetate (≥ 97.7%), acetonitrile (≥ 99.9%), tetrahydrofuran THF (≥ 99.9%), hexane (≥ 97%) and isopropanol (99.9%). Chloroform HiPerSolv Chromanorm for HPLC and methanol id Reagent Ph. Eur. for HPLC-gradient grade were purchased from VWR (Strasbourg, France). Acetone Multisolvent® HPLC grade ACS ISO UV-Vis Scharlau was purchased from Fischer (Illkirch, France).

Folin & Ciocalteu's phenol reagent 2 N was purchased from Sigma (St Quentin Fallavier, France) and sodium carbonate Acros Organics was obtained from Fischer (Illkirch, France).

The Pestanal analytical standards and the matrix analytical standards (triterpenoids, primary fatty alcohols, paraffins, monosaccharides and polyphenols) were supplied by Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France): boscalid (99.9%), captan (99.6%), chlorpyrifos-ethyl (99.9%), dithianon (97.4%), flonicamid (91.9%), fludioxonil (99.9%), pirimicarb (98.5%), propargite (99.5%), pyraclostrobin (99.9%), thiachloprid (99.9%), thiamethoxam (99.7%), oleanolic acid (≥ 97%), ursolic acid (≥ 90%), uvaol (≥ 95%), 1-hexadecanol C16-OH ReagentPlus (99%), 1-octadecanol C18-OH ReagentPlus (99%), 1-eicosanol C20-OH (98%), 1-docosanol C22-OH (98%), 1-tetracosanol C24-OH (≥ 99%) and 1-hexacosanol C26-OH (≥ 97%), 1-octacosanol C28-OH (≥ 99%), 1-triacontanol C30-OH (≥ 98%), heptacosane C27 (≥ 98%), nonacosane C29 (≥ 98%), α-D-glucose (96%), D(-)-fructose (99%), sucrose (99.5%) and dihydrated phlorizin (≥ 98.5%).

The QuEChERS reagent (a mixture of MgSO_4 , sodium chloride, disodium citrate and disodium hydrogen citrate; Q-Sep kit 26235), and a mixture of MgSO_4 , primary secondary amine (PSA) and C18 (tubes 26221 + 26125), were obtained from Restek (Lisses, France).

3. 2. 4. Sample processing and preparation

The sampling procedure, extraction and purification by the QuEChERS method have been described in detail elsewhere (Giacinti *et al.* 2016 [42]). In summary, the various samples (apple flesh, apple peel and whole apple) were ground and stored at -24°C until extraction. Homogenized samples (10 g) were subjected to extraction in 10 mL of acetonitrile with the QuEChERS Restek Q-SepTM salts kit. The entire supernatant (volumes ranged between 8.5-9.5 mL) was transferred to the Restek dSPE Q-SepTM adsorbent kit (mix of one tube 26221 – 8 mL and two tubes 26125 – 1 mL each). Acetonitrile was removed by evaporation to dryness. The resulting dry extracts were then dissolved in 500 μL ethyl acetate for injection into the gas chromatograph. QuEChERS extracts were identified as follows: FRUITVAR1, 2 or 3; FLESHVAR1, 2 or 3 and PEELVAR1, 2 or 3, for the fruit, flesh and peel extracts of each apple variety, respectively.

3. 2. 5. Preparation of standards and calibration curves

a- Preparation of solvent-matched and matrix-matched pesticide standards for GC/MSⁿ analysis

Pesticide standards were prepared as previously described (Giacinti *et al.* 2016 [42]). Stocks were prepared at a concentration of about 100 ng/ μL in ethyl acetate. Mixtures of standard stock solutions were diluted to give 80-8000 ng pesticide in 500 μL of ethyl acetate containing internal standards. Matrix-matched standards were obtained by spiking apple sample extracts from each variety. Apple sample extracts were prepared as described in section 3.2.4. Analyses were performed in an UltraTRACE gas chromatograph with a split/splitless injector, coupled to an ITQ900 ion trap mass spectrometer (Thermo Scientific, Courtaboeuf France). The same extracts were also analyzed with an HPTLC method.

b- Preparation of matrix compound standards for HPTLC/UV-Visible characterization and terpenoid quantification

Stocks were prepared at a concentration of about 1 g/L: monosaccharides, disaccharides and phloridzin in methanol, triterpenic acids, uvaol and paraffins in THF, and fatty alcohols in chloroform. They were analyzed simultaneously with the matrix-matched pesticide standards, by HPTLC.

3. 2. 6. Extraction of total waxes from apple peels

Apples were peeled off using a mechanical apple peeler. Peels were submitted to enzymatic digestion at $25 \pm 5^\circ\text{C}$ during 24 hours, in a citrate buffer 20 mM (pH = 4) and containing 16000 U L^{-1} of cellulase (from *Trichoderma longibrachiatum* ≥ 1 U L^{-1} , Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France) and 23600 U L^{-1} of pectinase (aqueous solution of *Aspergillus aculeatus* ≥ 3800 U L^{-1} , Sigma Aldrich). Citric acid anhydrous and sodium citrate were also purchased from Sigma Aldrich. Peels were then widely washed under demineralized water and frozen to -40°C to be lyophilized in the Cryovoire PILOT 27 (Cryonext, France). Finally, lyophilized peels were ground in an electric grinder. Total waxes were recovered by an extraction in chloroforme / methanol (2:1, V/V) in a Soxhlet apparatus. After

four complete cycles of solvents *i.e.* seven to eight hours, the extract was dried at 45°C under vacuum. The total waxes were then ground into a fine powder using an electric grinder.

3. 2. 7. High-performance thin-layer chromatography coupled with UV-visible spectrophotometry

a- Chemicals and materials

Merck HPTLC silica gel 60F₂₅₄ glass plates (20 x 10 cm, with a 150-200 µm-thick layer) were purchased from Chromacim (Moirans, France), HPTLC Nano-Sil NH₂/UV254 glass plates (10 x 10 cm, with a 200 µm-thick layer) were obtained from Macherey Nagel (Hoerdts, France). Plates were prewashed with isopropanol, dried in an oven at 120°C for 20 minutes, and stored in a dessicator until use. NH₂ plates were prederivatized just before samples application by dipping the first two centimeters of the plates in 2% formic acid (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France) in acetonitrile. The plates were allowed to dry at 50°C during ten minutes.

The anisaldehyde-H₂SO₄ derivatization reagent was prepared by mixing 0.5 mL of anisaldehyde (98%; Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France) with 50 mL of acetic acid (99%; Sigma Aldrich) and 1 mL of sulfuric acid (97%; Sigma Aldrich). The vanillin-H₂SO₄ derivatization agent was prepared by mixing 1-2 g of vanillin (99%; Alfa Aesar VWR, Strasbourg, France) with 100 mL of ethanol (99.8%; Sigma Aldrich) and 1 mL of sulfuric acid (97%; Sigma Aldrich).

b- HPTLC equipment and general procedures

Samples were applied to plates with the Autosampler ATS3 CAMAG (Muttentz, Switzerland). Ethyl acetate, methanol, chloroform or THF was used as a rinsing solvent, according to the solvent used for sample dilution. The following parameters were used: predosage volume 1000 nL, surplus volume 5000 nL, retractation volume 100 nL, delivery speed between 150 and 200 nL s⁻¹ depending on the nature of the solvent, filling speed 500 nL s⁻¹, rinsing time 10 s, compression volume 300 nL, compression time 10 s, decompression volume 240 nL. The first application position X was set at 15 mm and application position Y at 10 mm. The distance between tracks was calculated automatically from the number of deposits. The spray application mode was used, with a band velocity of 5 mm s⁻¹ and a start delay of 50 ms. Band length was fixed at 4 mm.

After migration, the plates were photographed with a digital camera (8 megapixels, with 1.5 µm pixels, f/2.2) under a UV lamp functioning at a power of 4 W, at 254 nm (BioBlock Scientific, France), and in daylight after derivatization.

For derivatization, the plates were dipped in a solution of anisaldehyde-H₂SO₄ or vanillin-H₂SO₄ with a TLC Immersion Device III CAMAG (Muttentz, Switzerland), at an immersion speed of 2 cm s⁻¹, with an immersion time of 3 s. They were then dried in an oven at 100°C for 8 minutes or 10 minutes respectively.

The plates were also scanned at 200 nm before chemical derivatization and at 500 nm after chemical derivatization, in the TLC Scanner 3 SC3 CAMAG, with deuterium and tungsten lamps (Muttentz, Switzerland). The slit dimension was set to 4 x 0.1 mm micro, the scanning speed to 5 mm s⁻¹ and data resolution was set to 50 µm step⁻¹. Remission and absorption were selected for the measurement type and mode, respectively. A second-order optical filter was used, and the detector mode and sensitivity were automatic.

The retardation factor R_f values were evaluated as the substance position with respect to the position of the solvent front measured from the sample application position.

The HPTLC autosampler and scanner, data acquisition and processing were controlled with WinCats 1.4.6.2002 Planar Chromatography Manager from CAMAG.

3. 2. 8. Analysis and quantification of matrix analytes in apple extracts

Volumes of 0 to 10 μL of QuEChERS extracts and standards were applied to HPTLC silica gel glass plates with ATS3 as described in section 3.2.5. b- (Table A.1 in the Supplementary material section). The spots were allowed to dry at room temperature for 30 minutes.

Migration was then carried out in a flat-bottomed glass chamber (24 x 24 x 8 cm) saturated with 45 mL of a mixture of hexane, chloroform and methanol (3:6:1, V/V/V). The solvent front was 60 mm from the edge of the plates. The plates were allowed to dry at room temperature for 30 minutes, derivatized by a solution of anisaldehyde- H_2SO_4 and then photographed and scanned as described in section 3.2.5.b.

Triterpenoids (oleanolic and ursolic acids and uvaol) were quantified in the QuEChERS extracts by HPTLC-UV-visible at 500 nm, after chemical derivatization with anisaldehyde- H_2SO_4 reagent. Triterpenoid contents (in $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ of extract) were evaluated by comparing their peak areas with those for calibration curves plotted using Microsoft Excel:Mac (2011). The levels of all the other components were determined by studying the areas of their chromatographic peaks on different densitograms.

3. 2. 9. Analysis of matrix analytes by the HTPSPE clean-up procedure of Oellig & Schwack 2011 [69]

Pesticide and triterpenic acid standards were applied onto HPTLC Nano-Sil NH_2 and silica gel glass plates with ATS3 as described in section 3.2.5.b. The spots were allowed to dry at room temperature for 30 minutes.

Two-dimensional chromatography was performed in a flat-bottomed glass chamber (18 x 15 x 3 cm). Acetonitrile (12 mL) was used as the first mobile phase to a migration distance of 75 mm. After drying, acetone (12 mL) was used as the second mobile phase, in the backwards direction to a migration distance of 46 mm. The plates were allowed to dry at room temperature for 30 minutes. They were then dipped in a solution of the derivatization agent, with the TLC Immersion Device III and dried in oven (8 minutes for anisaldehyde or 10 minutes for vanillin), photographed and scanned as described in section 3.2.5.b.

3. 2. 10. Determination of the total phenolic content of QuEChERS extracts by the method of Folin & Ciocalteu [70]

The total phenolic content of the QuEChERS extracts in acetonitrile was determined before concentration to dryness. These extracts were diluted in water ($n = 4$), with adjustment of the dilution for the measurement of absorbances in the middle of the calibration curve. The calibration curve are obtained with six standards of chlorogenic acid, with concentrations ranging from 0 to 100 mg L^{-1} . Standards and samples (20 μL in each case) were dispensed into the wells of a 96-well

plate, together with 10 μL of Folin & Ciocalteu reagent. The plate was shaken for 10 seconds and 170 μL of 2.36% sodium carbonate in water was added. The plate was shaken and then incubated at 45°C for 10 seconds every 15 minutes. After 45 minutes of incubation and shaking cycles, absorbance at 760 nm was read on a UV-Visible SpectroStarNano spectrophotometer (Labtech).

The results are expressed in micrograms of chlorogenic acid equivalents per 100 g of fresh matrix.

3. 2. 11. Relationship between the matrix effect in GC/MS² and the amount of matrix compounds in the extracts

The matrix effect (%ME) was calculated from the slopes of the calibration curves obtained in solvent (S_s) and in matrix (S_m) (Table A.2):

$$\%ME = \frac{S_m - S_s}{S_s} * 100$$

The matrix effect values were then plotted against the peak areas on HPTLC densitograms. Finally, matrix effect values were plotted against total phenolic and triterpenoid contents, which were quantified for all QuEChERS extracts.

3. 2. 12. Statistical analysis

The software XLSTAT V 2015.2.01. (Addinsoft, Paris, France) was used to calculate the Pearson's correlation coefficients (r).

3. 3. Results and discussion

3. 3. 1. Study of the target matrix analytes in QuEChERS extracts of apples

Analytical conditions were established for separation of the targeted matrix analytes by functional group. The HPTLC plate was first scanned at different UV wavelengths. Five of the eight standards were detected at 200 nm (Figure III-9, B). Sugars, paraffins and fatty alcohols do not absorb at 200 nm because they lack chromophores. Triterpenoids have few chromophores and they absorb only at 200 nm in the UV domain. Phlorizin moved to an R_f of 0.05. All the pesticides were retarded at the same R_f value, 0.52. The oleanolic and ursolic acids were overlapped at an R_f of 0.58, whereas uvaol was retarded at an R_f of 0.62.

The compounds on the HPTLC plate were then derivatized with anisaldehyde. Anisaldehyde was chosen for this step because it enhances the detection of triterpenoids, sugars and steroids. Triterpenoids appear as violet zones on a pink background (Figure III-9, A). Sugars give dark green zones, whereas phlorizin gives an orange zone. The track of paraffins shows light green zones at $R_f = 0.42$ and fatty alcohols give a white halo enclosed by a pink line at $R_f = 0.75$ in this system. Paraffins and fatty alcohols were not visible after derivatization with anisaldehyde as well as the pesticide mixture. The plate was scanned at 500 nm. Five of the eight standards were detected in these conditions: the sugar mixture, phlorizin, triterpenoids, and the paraffin mixture (Figure III-9, C). The sugar mixture remained very close to the deposit line. Anisaldehyde derivatization did not enhance the detection of paraffins, alcohols or pesticides. Paraffins and fatty primary alcohols were detected after derivatization with primuline at $R_f = 0.99$ and $R_f = 0.76$ respectively (data not shown). Derivatization with anisaldehyde facilitated the qualitative and quantitative HPTLC analysis of the

target matrix compounds in apple matrices spiked with pesticides, without interaction between these compounds and the pesticides themselves.

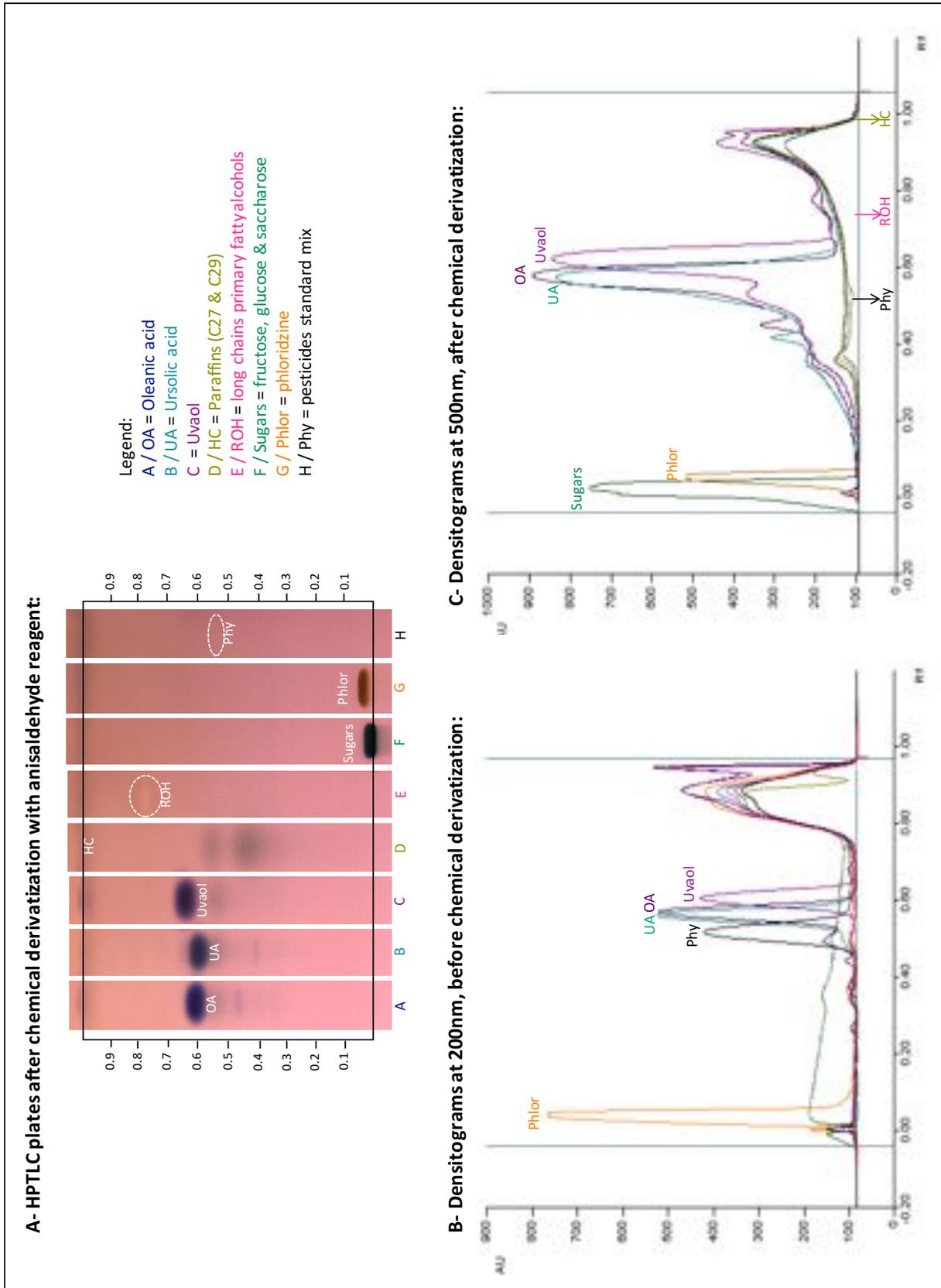


Figure III-9: HPTLC (Silica Gel plates) profiles and densitograms for matrix analyte standards before (A) and after (B and C) derivatization with anisaldehyde reagent

The separate study of flesh, fruit and peel QuEChERS extracts by HPTLC-UV-Visible revealed the presence of triterpenic acids and uvaol, and many other matrix compounds (Figure A.1 in the Supplementary material section). Thirteen zones of matrix compounds (MCi) were detected on the densitograms for FLESHVAR1 and FLESHVAR2, and 10 were detected on that for FLESHVAR3. Fourteen zones of MCi were detected for FRUITVAR1 and 15 each for FRUITVAR2 and FRUITVAR3. Sixteen zones of matrix compounds were detected for PEELVAR1, and 17 each for PEELVAR2 and PEELVAR3.

The densitograms differed in terms of the nature (some compounds detected and others not detected) and/or concentrations of the compounds identified (Figure III-10, A, and B). On the basis of the R_f values of the matrix analytes standards, glucose and fructose were detected in all samples. The compounds at $R_f = 1$ may be wax esters. Phlorizin and paraffins may have been present in the extracts. However, the principal difference between matrices observed was the presence of triterpenic acids in fruit and peel QuEChERS extracts and the absence of these compounds from flesh extracts ($< 0.05 \text{ mg kg}^{-1}$ Figure III-10, B and Figure A.2 in the Supplementary material section). Triterpenoid concentration and total phenolic contents are shown in the histograms in Figure III-11.

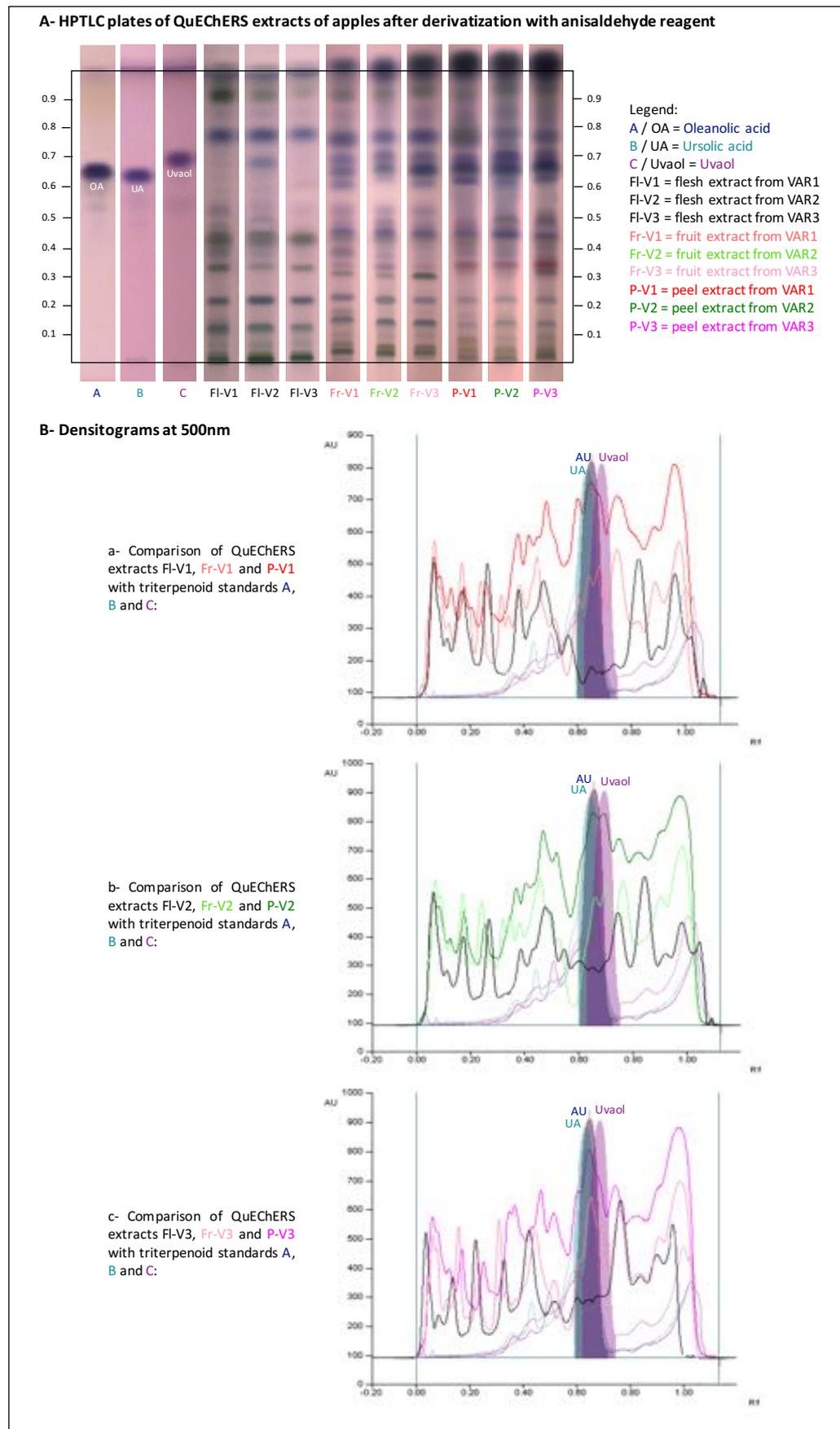


Figure III-10: HPTLC (Silica Gel plates) profiles (A) and densitograms at 500nm (B) after derivatization with anisaldehyde of QuEChERS extracts of apples from VAR1 (a), VAR2 (b), and VAR3(c)

Triterpenic acid concentration was higher in peel than in fruit extracts. Peel extracts from VAR2 and VAR3 had triterpenic acid concentrations twice that for VAR1. Uvaol concentrations in VAR2 extracts were higher than those in extracts from the other two varieties. Indeed, this compound was detected in flesh and its concentration in peel extracts from VAR2 were 10 times those in peel extracts from VAR1 and VAR3. Ursolic acid is one of the major cyclic components of the cuticular waxes of apples (Fernandes *et al.* 1964 [60], Kolattukudi 1984 [61], McGhie *et al.* 2011 [67], Morozova and Sal'kova 1966 [71]).

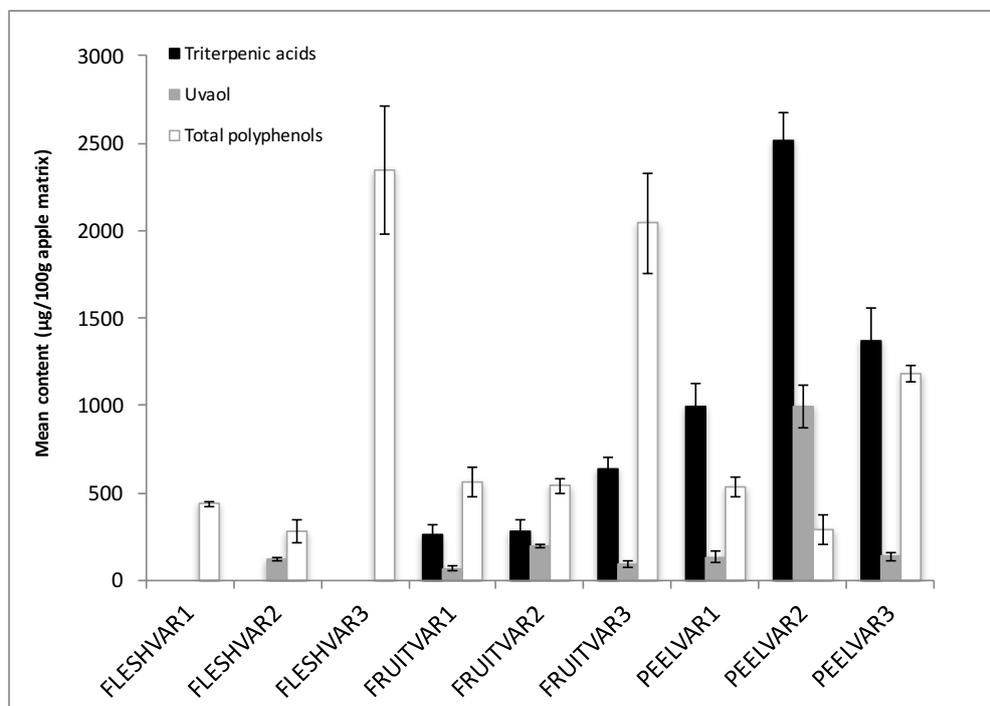


Figure III-11: Mean terpenoid and polyphenol concentrations (n=5) in QuEChERS extracts from different apple matrices

Total phenolic contents followed a pattern very different from that of triterpenoid content. The values are generally normalized by expression as gallic acid equivalents. However, the results in Figure III-11 are expressed as chlorogenic acid equivalents, because this compound is more prevalent in apples.

In VAR1, total phenolic content was similar for flesh, fruit and peel extracts, at about 5 mg chlorogenic acid equivalent per kilogram of matrix. In VAR2, the total phenolic content of the fruit extract was about twice that of the flesh and peel extracts. VAR3 had the highest total phenolic content of all the varieties tested, about four to ten times higher than those for the other varieties. In VAR3, total phenolic content was higher for the flesh extract than for the fruit and peel extracts. The total phenolic content of the peel extract was about half that of the flesh and fruit extracts.

As it is stated in the literature, the different extracts studied here may not have contained the same polyphenols, with the polyphenol composition of the extract depending on the origin of the matrix. Indeed, the distribution of polyphenols in apple depends on the functional groups of these molecules. For example, flavonols and flavanols are found in the peel, whereas the phenolic acids are mostly located in the flesh. The core and seeds are richer in dihydrochalcones than the peel (Awad *et al.* 2000 [72]). Expressing the results as chlorogenic acid equivalents may have resulted in the concentrations of some polyphenols being overestimated and those of others underestimated, depending on the absorbance of the complex they form with Folin & Ciocalteu reagent. However, the

differences observed may reflect differences in anthocyanin content. Anthocyanins are characteristic polyphenols responsible for the red color of some apple varieties, such as VAR1 and VAR3. Indeed, the peel of VAR1 and VAR3 yielded red and pink extracts, respectively. Apples from VAR2 are markedly less red in color and their extracts were yellow-orange in color if oxidization occurred during grinding, and greenish yellow otherwise. For all varieties, oxidization of the sample during grinding resulted the extract being more yellow in color. However, anthocyanins are particularly sensitive to oxidation. Nevertheless, after the SPE dispersive step of the QuEChERS extraction procedure, all the extracts were similarly yellow (Figure A.3 in the Supplementary material section).

It could be argued that the purification step, during which matrix analytes are likely to be adsorbed onto the stationary phases (PSA, C18, GCB), and the sensitivity of some molecules to oxidation may account for the pattern of total phenolic content observed here.

3. 3. 2. Relationship between negative matrix effects in GC/MS² ion trap and co-injected matrix analytes

An analysis of the pesticide content of these extracts without normalization of the peak responses in GC/MS² ion trap experiments showed that the extent of the matrix effect depended on the pesticide molecules (Table A.2 in the Supplementary material section). Negative results were obtained for peel extracts, whereas positive results were obtained for flesh extracts. Statistical analysis revealed an impact of the nature of the apple matrix but no significant effect of apple variety. Fludioxonil and boscalid were the pesticides most sensitive to matrix effects (Giacinti *et al.* 2016 [42]).

The occurrence of a matrix effect reflects the nature and quantities of analytes from the matrix co-extracted during the QuEChERS procedure. As the chemical compositions of the flesh and the peel of apples were different (Section 3. 3. 1.), it was therefore hypothesized that the negative matrix effects observed in peel extracts might reflect the presence, in sufficiently large quantities, of one or several molecules able to interfere with pesticides during hot splitless injection.

An HPTLC/UV-Visible analysis of all the extracts led to the identification of a large number of analytes (Section 3.3.1., and Figure A.1 in the Supplementary material section) likely to be involved in the observed matrix effects.

To examine the relationship between the MCI matrix data containing peak area responses for the nine apple matrices and the matrix effect data for each pesticide, Pearson correlation coefficients were calculated. A strong significant correlation was observed (p -values < 0.05) between all the pesticides and the content of oleanolic and ursolic acids ($-0.833 < r < -0.954$; Table A.3 in the Supplementary material section).

3. 3. 3. Relationship between the negative matrix effect observed in GC/MS² and triterpenic acid contents

Matrix effect values were plotted against triterpenic acids content (Figure III-12). A linear relationship was observed between matrix effect and triterpenic acids content for each pesticide ($0.72 < R^2 < 0.88$).

Matrix effects are known to be controlled by a number of factors simultaneously. In hot splitless injection, for example, many compounds of different volatilities may accumulate, leading to interference resulting in a globally positive or negative matrix effect. In flesh extracts, in which no

triterpenic acids were detected, matrix effects were generally positive and very strong for fludioxonil and boscalid (between 200 and 400%). These effects were much weaker (between 50 and 100%) for flonicamid, pirimicarb and chlorpyrifos. Propargite is a particular case, for which the matrix effect is always negative, regardless of the nature of the matrix. In VAR2 and VAR3, the values are really closed to zero, meaning that the matrix effect for this compound was almost non-existent in these flesh extracts.

Thus, flesh extracts probably contain compounds that enhance the chromatographic signal in GC/MS² in the absence of triterpenic acids. It has been stated in the literature that compounds like sorbitol can act as analytes' protectants during hot splitless injection (Andrade *et al.* 2011 [27]). Sugars are the main components of flesh. It is likely that analytes from flesh matrices could enhance the pesticides' chromatographic responses and cause a positive matrix effect.

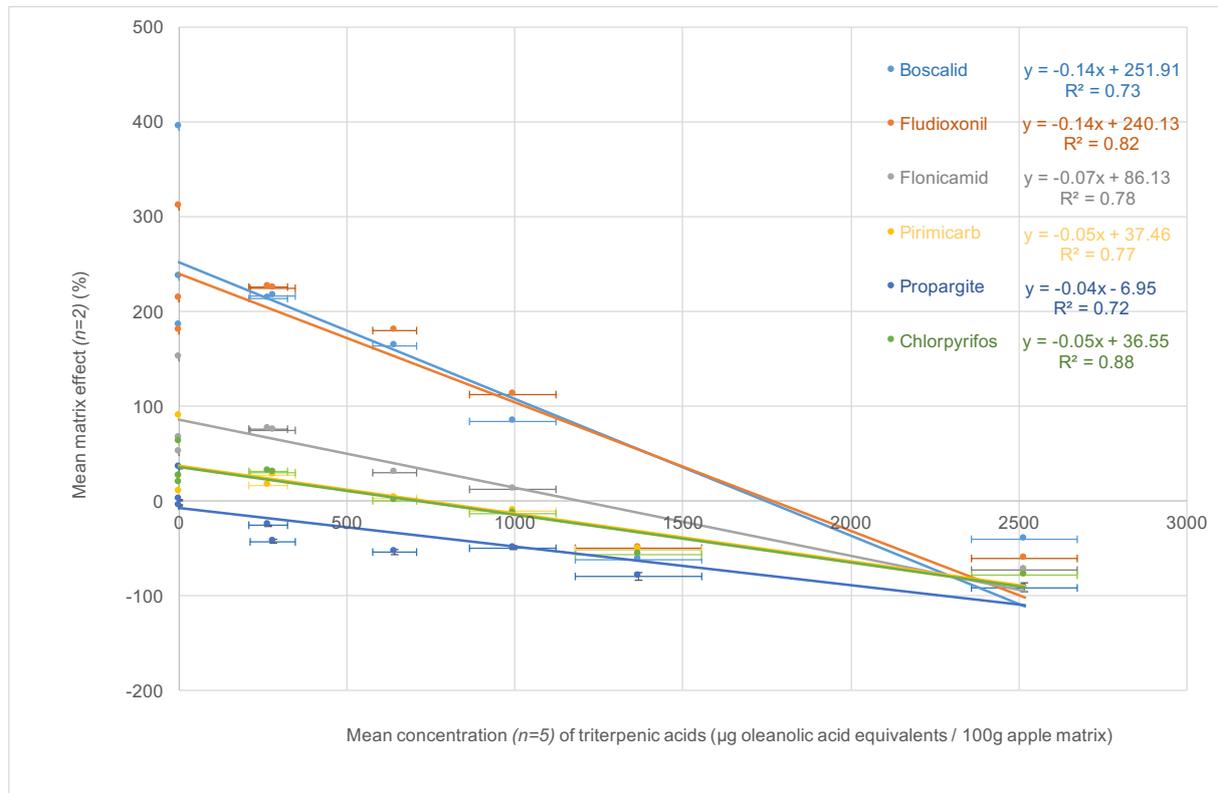


Figure III-12: Linear regression between the matrix effect and triterpenic acid content in the different apple matrices

In 1993, Erney *et al.* (Silvestro *et al.* 2013 [41], Erney *et al.* 1993 [73]) were the first to identify “matrix-induced chromatographic response enhancement” in analyses of organophosphates in milk and butter extracts. They claimed that, when standards are injected in solvents, analytes could be adsorbed onto the active sites of the injector and column, or degraded by catalytic thermodecomposition at these sites (presence of metals and free silanols on the glass liners). When standards are injected in matrix, the matrix compounds block these sites, globally enhancing the standard signals. The matrix effect thus results from the analytes co-extracted from the matrix, generally in larger amounts than the analytes of interest. The smallest amounts (ultratracés) of co-extracted analytes are associated with the most positive matrix effects. Quantitative data may be unreliable if calibration curves are not prepared in matrix extracts.

At the same time, the number of new active sites increases, because of the progressive accumulation of non-volatile compounds in the inlet liner and in front of the column. This could lead to a decrease in the chromatographic signal, referred to by Hajslova and Cajka in 2008 as “matrix-induced diminishment” [40]. These two phenomena occur almost simultaneously, and it is therefore impossible to exert any real control over the formation of new active sites due to the accumulation of non-volatile analytes. Kowalski *et al.* in 2013 [32] showed that pesticide molecules could react with matrix compounds and degrade during hot splitless injection, and even during extraction steps in some cases.

Apple peel contains large amounts of cuticular lipids. The soluble waxes protecting the cuticle consist of long-chain ($n = 20-40$ carbon atoms) molecules and terpenoids, of various degrees of volatility (Table III-3). These molecules can accumulate in the inlet liner and create active sites capable of reacting with pesticides, decreasing the amount of pesticide reaching the mass detector. The propensity of each pesticide to interact with the active molecules may result in matrix effects of various strengths.

3. 3. 4. So, what happens during hot splitless injection to suppress the pesticide signal during co-injection with triterpenic acids?

In gas phase, a proton transfer reaction can occur between a compound HA which can be deprotonated, and a compound B, which can be protonated. The gas phase acidity (GA) of HA is the free energy change for the reaction $HA \rightarrow A^- + H^+$. The gas phase basicity (GB) is the free energy of the reaction $BH^+ \rightarrow B + H^+$ (Moylan and Brauman 1983 [74], Shimshi *et al.* 1995 [75], Bouchoux 2007 [76]).

Triterpenic acids are reactive species because of their carboxylic acid group COOH, whose proton can undergo a proton transfer reaction. Boscalid (I), chlorpyrifos-ethyl (II), flonicamid (III), fludioxonil (IV) and pirimicarb (V) contain nitrogen involved in different amino groups that could behave as bases. Pesticides (I) to (V) contain heterocyclic amines: (I) to (III) have a pyridine ring, (IV) a pyrrole ring and (V) a pyrimidine ring. (I), (III) and (V) have an amide group. (III) and (IV) have a nitrile group. Propargite has no basic amino groups (Figure A.4 in the Supplementary material section).

The relationship between the matrix effect on boscalid and fludioxonil and triterpenic acid content is the strongest of all the six pesticides (similar slopes $a = -0.14$, Figure III-12). The relationship between the matrix effect on pirimicarb and triterpenic acid content is similar to that for chlorpyrifos-ethyl ($a = -0.05$) and less pronounced than for flonicamid ($a = -0.07$). Finally, propargite is less sensitive to matrix effects: the slope of the linear regression for the relationship between the matrix effect on propargite and triterpenic acid content was lowest for this compound ($a = -0.04$).

Most GB values for nitrogen compounds are available in the literature (Raczynska *et al.* 2016 [77], Bouchoux and Eckert-Maksic 2016 [78]) but not for the targeted pesticides. It was observed that gas phase basicity increases from nitriles < amines < amides < pyrroles < pyrimidines < pyridines. The nature, position and number of substituents on the nitrogen function greatly modify the gas basicity values. Substituents act on protonation by the electrostatic effects and the resonance of π electrons (Bouchoux 2007 [76]). There are globally two kinds of substituents in the gas phase: the ones that participate to charge stabilization (alkyl groups, aromatic cycles) and those that destabilize the charges in the protonated forms (halogens) (Raczynska *et al.* 2016 [77]). It has been observed that para-substituents are more influent than meta and ortho-substituents.

Propargite, that does not contain nitrogen, is the less basic of all the six pesticides and does not highly interact with triterpenic acids. Pesticides containing pyridine cycles (boscalid, chlorpyrifos and flonicamid) are expected to have the most important GB values. The GB value of pyridine is 898.1 kJ/mol. It decreases to 862 kJ/mol in p-trifluoromethylpyridine. Boscalid is then expected to have the most important GB value whereas chlorpyrifos the least. In fludioxonil, the preferred site of protonation could be the cyano nitrogen atom. The protonated form is highly stabilized by the pyrrole and the aromatic rings. This could explain the high reactivity of the fludioxonil with the triterpenic acids.

Following the injection of highly concentrated extracts, the chromatographic system becomes dirty, suppressing the ion signal. Efficient cleaning is thus required, with replacement of the inlet liner and the pre-column (and/or the removal of several centimeters at the start of the column, particularly if it is not preceded by a pre-column) and cleaning of the ion volume and the detector source. Merely cleaning the detector does not restore sensitivity: signal suppression seems to occur mostly upstream, in the chromatograph. Marked fouling of the inlet liner has been observed, with successive injections of highly concentrated extracts leading to a greenish-yellowish deposit within the glass liner. Thus, if injections of highly concentrated extracts are required to highlight the amounts of pesticides in more representative samples, as demonstrated in a previous study (Giacinti *et al.* 2016 [42]), then effective clean-up techniques for extracts are essential.

3. 3. 5. Purification of apple peel QuEChERS extracts by HPTLC, to minimize negative matrix effects in subsequent GC/MS² ion trap analysis

A recently developed clean-up concept in the multi-residue analysis of pesticides based on planar solid phase extraction followed by chromatographic analysis (Oellig and Schwack 2011 [69]) could be used to purify extracts. Oellig and Schwack used thin-layer chromatography (TLC) to separate pesticides from matrix compounds and to focus them into a sharp zone, followed by extraction of the target zone through TLC-MS Interface before chromatography. Their method was used to analyze a QuEChERS extract of peel from organic VAR1 apples with a standard mixture of target pesticides both on HPTLC NH₂ plates and on TLC Silica foils (Data not shown). Overlapping of pesticides with some matrix compounds at R_f = 0.68 was observed, regardless of the nature of the stationary phase. Further investigations were then undergone.

On HPTLC NH₂ plates prederivatized with 2% formic acid in acetonitrile, triterpenic acids were retarded at R_f = 0, far away from boscalid, chlorpyrifos, flonicamid, fludioxonil and boscalid, all retarded at R_f = 0.68 as well as tetrahydroptalimid, the metabolite of captan (Figure III-13, A). It is worth noticing that captan and dithianon were not retarded at the same R_f that of the other pesticides. In this analysis, the signal of captan showed two peaks at R_f = 0 and R_f = 0.9 and dithianon three peaks at R_f = 0, R_f = 0.35 (tailing peak) and R_f = 0.9. On HPTLC NH₂ plates without prederivatization, triterpenic acids, captan and dithianon were all retarded at R_f = 0 whereas the other pesticides were retarded at R_f = 0.68 (Figure III-13, B). Prederivatization did not change the densitographic profile, anyway the oleanolic acid turned into a well-defined Gaussian-like peak. On HPTLC Silica plates, all standards were retarded at R_f = 0.68 (Figure III-13, B').

The method developed by Oellig and Schwack well separates triterpenic acids from boscalid, chlorpyrifos, flonicamid, fludioxonil and pyraclostrobine. As the negative matrix effects observed in GC/MS² seem to be due to the presence of large amounts of triterpenic acids, it is an effective

method to purify highly concentrated peel extracts. The main drawback is the lack of recovery of captan and dithianon, two pesticides out of the 11 mostly used to treat apple orchards in South West of France (Giacinti *et al.* 2016 [42]). Using Silica plates did not solve the problem by overlapping all the compounds.

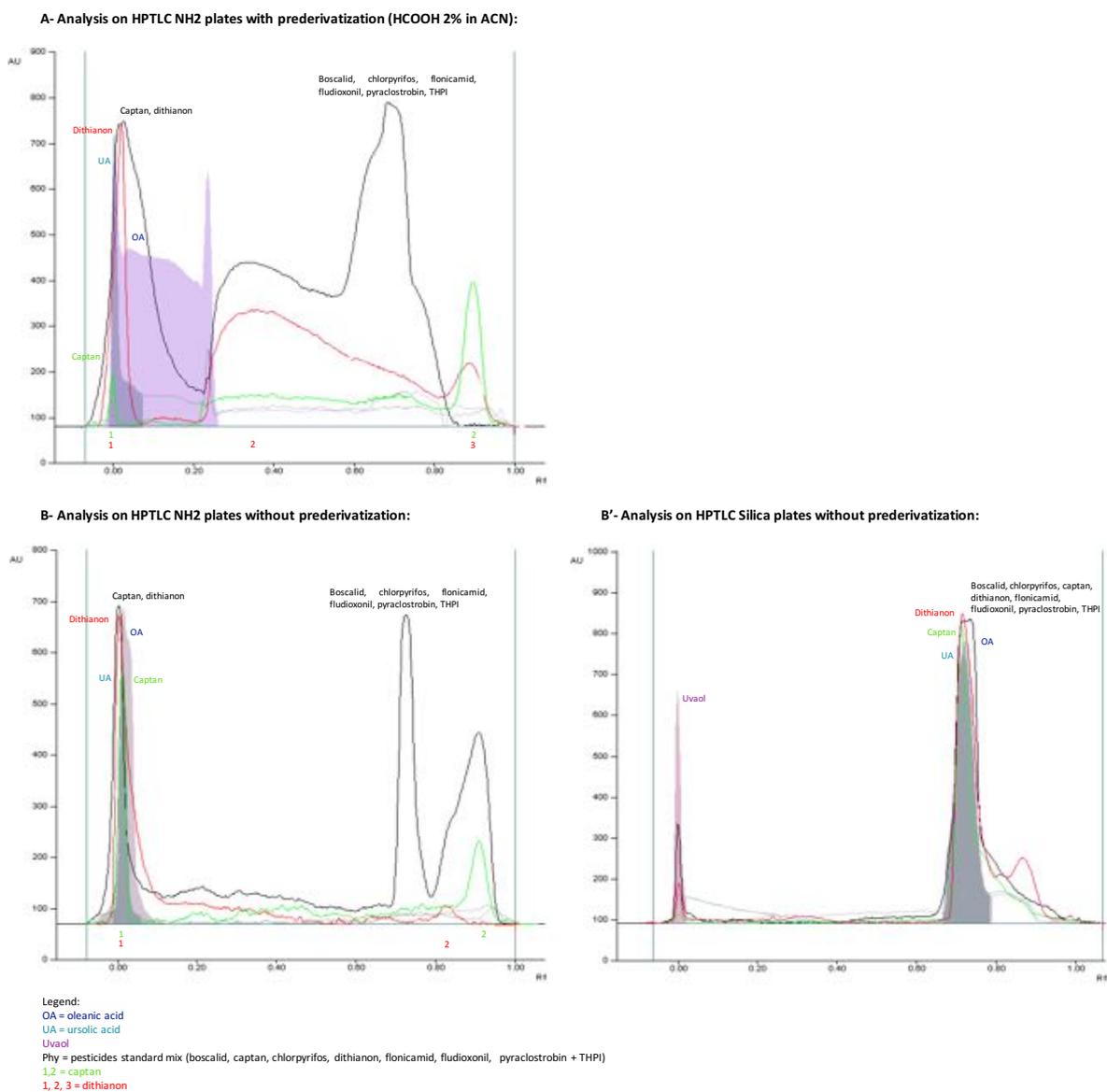


Figure III-13: Densitograms at 200 nm of pesticide and triterpenic acid standards on (A) HPTLC NH₂ plates after prederivatization with formic acid (2 % in acetonitrile), (B) HPTLC NH₂ plates without prederivatization and (B') HPTLC Silica Gel plates without prederivatization, based on the HTpSPE clean-up method developed by Oellig & Schwack 2011 [69]

The HPTLC method optimized in this study for the analysis of matrix compounds and the quantitation of the triterpenoids (Figure III-14, A), separated pesticides (Rf = 0.58) and triterpenic acids (Rf = 0.62).

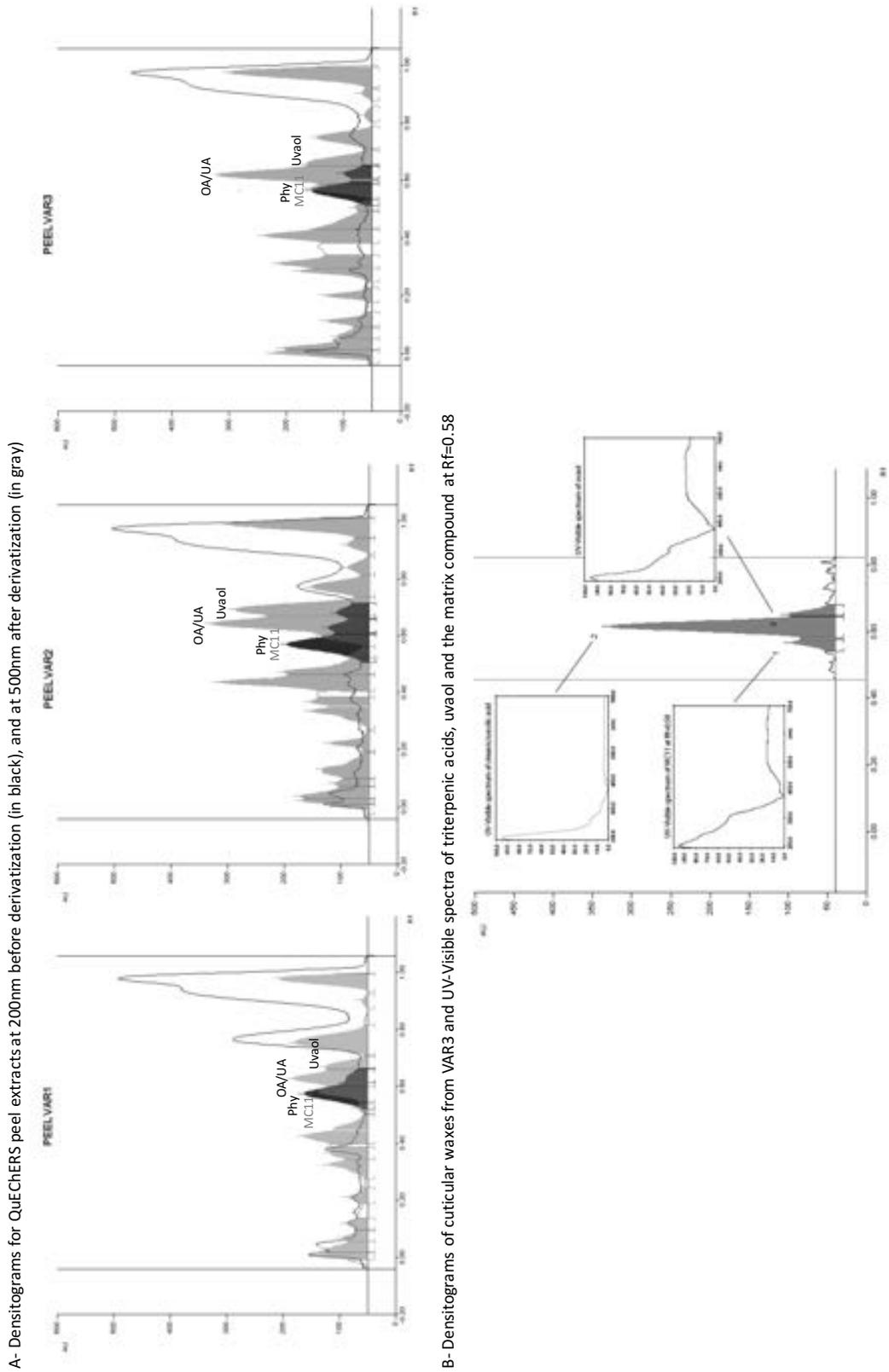


Figure III-14: (A) Densitograms of QuEChERS extracts of peel spiked with pesticide standards before and after chemical derivatization at 200 nm (in gray) and 500 nm (in black), and (B) HPTLC/UV-Visible characterization of terpenoids in apple cuticular waxes

All the eleven previous studied targeted pesticides overlapped at $R_f = 0.58$ and were detectable only before chemical derivatization at 200 nm, whereas the triterpenic acids were also detectable at 500 nm, after chemical derivatization with the anisaldehyde- H_2SO_4 reagent. Derivatization highlighted another zone of matrix compounds MC11 at the same R_f as pesticides (Figure A.1 in the Supplementary material section) on the densitograms of peel extracts (Figure III-14, A). This zone was also detected in the cuticular waxes (Figure III-14, B). UV spectra were registered for the three zones of matrix compounds in cuticular waxes from apples of VAR3: MC11 at $R_f = 0.58$, triterpenic acids at $R_f = 0.62$ and uvaol at $R_f = 0.66$ (Figure III-14, B). After derivatization, MC11 was detected as a purple spot on a pink background with a R_f very close to those of triterpenoids, particularly triterpenic acid. Moreover, a study of its UV spectrum, with only one λ_{max} at 200 nm, as for the terpenoids studied, suggested that this molecule might also be a terpenoid. The correlation between MC11 and the calculated matrix effects in GC/MS² was not significant ($p > 0.05$, Table A.3 in the Supplementary material section).

This method does not provide the same separation efficiency between pesticides and triterpenic acids as the one of Oellig and Schwack, anyway it separates pesticides and triterpenic acids allowing at the same time the recovery of captan and dithianon, two pesticides widely used in French apple orchards. Used as a purification step before hyphenated HPTLC/GC/MS² ion trap techniques for example, it would help to minimize matrix effects occurring during pesticides analysis in highly concentrated QuEChERS extracts from apple samples.

3. 4. Conclusion

The previously published GC/MS² method (Giacinti *et al.* 2016 [42]) was successfully extended to the identification of matrix analytes in QuEChERS extracts of fruit, flesh and peel, through HPTLC analysis of the major molecular markers representative of each type of matrix. Peel extracts are characterized by particularly high levels of oleanolic and ursolic acids (10-25 mg/kg). There is a relevant relationship between negative matrix effects and the concentration of these acids. According to gas phase acid-base chemistry, the pesticides can react as proton acceptor and the triterpenic acids as proton donor. Boscalid and fludioxonil were the pesticides found to interact most with triterpenic acids. They are more basic than flonicamid, pirimicarb, chlorpyrifos and propargite, due to the nature of their nitrogen protonable site and the substituents involved in the stabilization of the charges of the protonated species. The higher concentrations of triterpenic acids in peel extracts suppress the signal, this effect being less marked for flonicamid, pirimicarb, chlorpyrifos and propargite.

The proposed HPTLC method involves the overlapping of pesticides combined with their separation from most of the matrix compounds, including oleanolic and ursolic acids in particular. Thus, the combination of this method with a TLC/MS Interface could result in a more efficient clean-up of QuEChERS extracts before GC analysis. This method could be transposed to purification on columns or by flash chromatography.

Appendix. Supplementary data

Supporting information

Sample	Volume (μL) used for characterization	Volume (μL) used to investigate the ME*/matrix compounds relationship	Volume (μL) used for terpenoid quantification
QuEChERS extracts FRUITVAR1, 2 & 3 ($n = 5$)	10	1	4
QuEChERS extracts FLESHVAR1, 2 & 3 ($n = 5$)	10	1	10
QuEChERS extracts PEELVAR1, QuEChERS extracts PEELVAR2 & 3 ($n = 5$)	10	1	2 1
Pesticide mixture (0.2 mg/L)	10	-	-
Oleanolic acid (1 g/L)	5	1	0 – 1.5
Uvaol (1 g/L)	5	1	0 – 1.5
Ursolic acid (1 g/L)	5	-	-
Paraffins C27 and C29 (0.5 g/L each)	5	-	-
Primary fatty alcohols (0.125 g/L each)	5	-	-
Sugar mixture (1 g/L each)	5	-	-
Phlorizin (1 g/L)	5	-	-

*ME = matrix effect

Table A.1: Analytical parameters for the characterization of matrix compounds and the quantification of terpenoids in QuEChERS extracts by HPTLC/UV-Visible

Active agent	FLESH VAR1	FLESH VAR2	FLESH VAR3	FRUIT VAR1	FRUIT VAR2	FRUIT VAR3	PEEL VAR1	PEEL VAR2	PEEL VAR3
Flonicamid	168	68	48	72	69	23	27	- 73	- 50
	136	64	54	79	81	38	- 3		- 53
Pirimicarb	98	25	5	20	17	- 2	- 6	- 78	- 49
	81	28	14	13	37	9	- 16		- 53
Propargite	35	7	- 6	- 25	- 42	- 57	- 35	- 91	- 80
	36	- 5	- 3	- 27	- 43	- 50	- 63		- 80
Chlorpyrifos	59	29	16	30	24	- 8	- 3	- 78	- 57
	66	24	23	34	37	9	- 24		- 56
Fludioxonil	315	214	176	208	222	177	135	- 60	- 52
	308	212	184	244	226	183	89		- 47
Boscalid	418	246	183	202	219	146	96	- 40	- 71
	370	228	188	225	213	182	73		- 53

Table A.2: Matrix effect values evaluated without normalization of chromatographic peak area (from a previous study by Giacinti et al., 2016 [42])

Variables	Fioncamid	Pirimicarb	Propargite	Chlorpyrifos-ethyl	Fludioxonil	Boscalid	Sugar mix/Phlor	Fru/Phlor	MC1	MC2	MC3	MC4	MC5	MC6	MC7	MC8	MC9	MC10	MC11	OAUUA	Uvaol	MC12	MC13	MC14	Esters/paraffins	
Fioncamid	1																									
Pirimicarb	0.990****	1																								
Propargite	0.917***	0.917***	1																							
Chlorpyrifos-ethyl	0.970****	0.987****	0.866**	1																						
Fludioxonil	0.977****	0.960****	0.921***	0.969****	1																					
Boscalid	0.987****	0.978****	-0.714*	0.976****	0.976****	1																				
Sugar mix/Phlor	0.972****	0.976****	-0.736*	0.969****	0.976****	0.976****	1																			
Fru/Phlor	0.789*	0.789*	0.772*	0.694*	0.694*	0.694*	0.694*	1																		
MC1	0.357	0.287	0.022	0.301	0.169	0.169	0.169	0.169	1																	
MC2	-0.243	-0.224	-0.329	-0.297	-0.583	-0.334	-0.334	-0.334	0.357	0.287	0.022	0.301	0.169	0.169	0.169	0.169	0.169	0.169	0.169	0.169	0.169	0.169	0.169	0.169	0.169	
MC3	0.651	0.613	0.582	0.573	0.465	0.421	0.079	-0.299	-0.299	-0.299	-0.299	-0.299	-0.299	-0.299	-0.299	-0.299	-0.299	-0.299	-0.299	-0.299	-0.299	-0.299	-0.299	-0.299	-0.299	
MC4	0.470	0.413	0.219	0.520	0.465	0.421	0.079	0.130	0.130	0.130	0.130	0.130	0.130	0.130	0.130	0.130	0.130	0.130	0.130	0.130	0.130	0.130	0.130	0.130	0.130	
MC5	0.127	0.138	-0.190	0.163	0.240	0.141	-0.073	0.232	0.232	0.232	0.232	0.232	0.232	0.232	0.232	0.232	0.232	0.232	0.232	0.232	0.232	0.232	0.232	0.232	0.232	
MC6	-0.025	-0.066	0.059	-0.104	-0.165	-0.081	0.321	0.520	0.520	0.520	0.520	0.520	0.520	0.520	0.520	0.520	0.520	0.520	0.520	0.520	0.520	0.520	0.520	0.520	0.520	
MC7	-0.307	-0.329	-0.383	-0.297	-0.375	-0.431	0.857**	0.514	0.514	0.514	0.514	0.514	0.514	0.514	0.514	0.514	0.514	0.514	0.514	0.514	0.514	0.514	0.514	0.514	0.514	
MC8	-0.182	-0.291	-0.367	-0.175	-0.190	-0.219	0.507	0.718*	0.718*	0.718*	0.718*	0.718*	0.718*	0.718*	0.718*	0.718*	0.718*	0.718*	0.718*	0.718*	0.718*	0.718*	0.718*	0.718*	0.718*	
MC9	-0.486	-0.451	-0.512	-0.559	-0.536	-0.451	0.401	0.930	0.930	0.930	0.930	0.930	0.930	0.930	0.930	0.930	0.930	0.930	0.930	0.930	0.930	0.930	0.930	0.930	0.930	
MC10	0.397	0.355	0.402	0.325	0.264	0.336	-0.447	0.457	0.457	0.457	0.457	0.457	0.457	0.457	0.457	0.457	0.457	0.457	0.457	0.457	0.457	0.457	0.457	0.457	0.457	
MC11	-0.543	-0.562	-0.576	-0.544	-0.540	0.810	0.744*	0.845**	0.845**	0.845**	0.845**	0.845**	0.845**	0.845**	0.845**	0.845**	0.845**	0.845**	0.845**	0.845**	0.845**	0.845**	0.845**	0.845**	0.845**	
OAUUA	-0.833**	-0.834**	-0.954****	-0.856**	-0.833**	-0.861**	0.815**	0.845**																		
Uvaol	-0.635	-0.681*	-0.720*	-0.647	-0.613	-0.605	0.895*	0.816	0.816	0.816	0.816	0.816	0.816	0.816	0.816	0.816	0.816	0.816	0.816	0.816	0.816	0.816	0.816	0.816	0.816	
MC12	0.363	0.306	0.150	0.464	0.462	0.304	0.131	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	
MC13	-0.763**	-0.775**	-0.665	-0.830**	-0.813**	-0.705**	0.426	0.481	0.481	0.481	0.481	0.481	0.481	0.481	0.481	0.481	0.481	0.481	0.481	0.481	0.481	0.481	0.481	0.481	0.481	
MC14	0.657	0.610	0.436	0.630	0.605	0.622	0.039	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	
Esters/paraffins	-0.790*	-0.757*	-0.854**	-0.820**	-0.828**	-0.829**	0.692*	0.922***																		
Degree of statistical significance:	*: p < 0.05; **: p < 0.01; ***: p < 0.001; ****: p < 0.0001																									

Table A.3: Pearson correlation coefficients between matrix effects and matrix compounds MCi levels (areas of peaks) measured in the nine studied apple extracts (The coefficients in bold are significant)

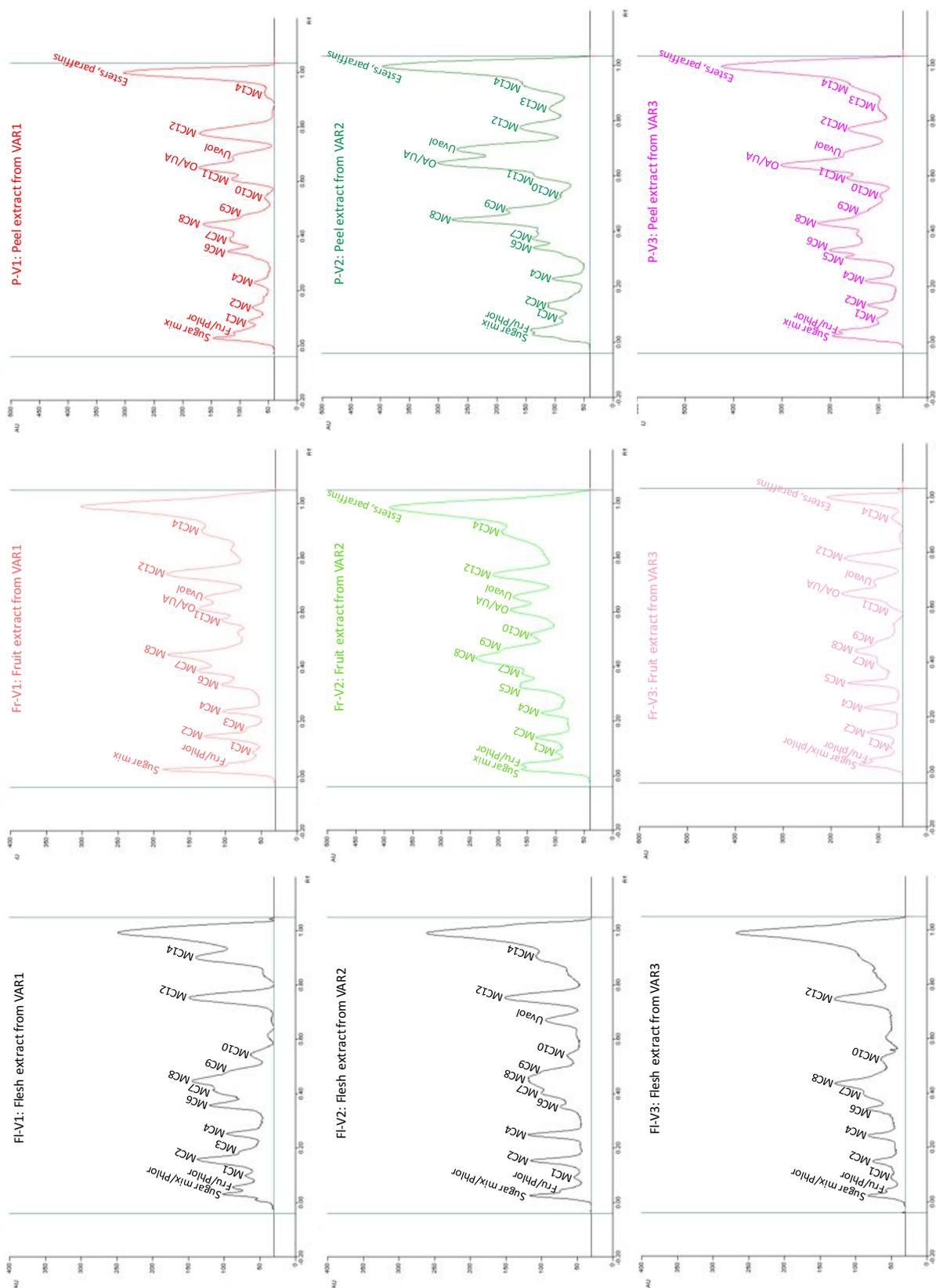
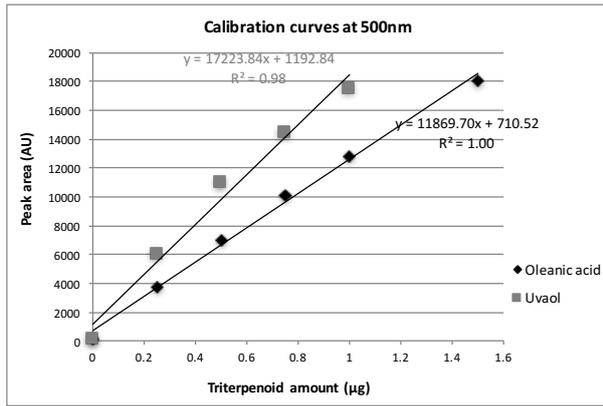


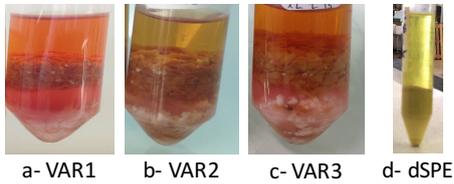
Figure A.1: Densitograms of QuEChERS extracts of fruit, flesh and peel of the three varieties of apples. Identification of the matrix compounds (MCi) detected in 1 μ L of QuEChERS extract by HPTLC-UV-Visible at 500 nm, on Silica Gel plates after chemical derivatization with anisaldehyde reagent



Matrix compound	Oleanic acid	Uvaol
Linear domain (µg)	0.0 – 1.5	0.0 – 1.0
LOD (mg/kg flesh matrix)	0.05	0.025
LOD (mg/kg fruit matrix)	0.13	0.06
LOD (mg/kg peel matrix)	0.25 – 0.50	0.13 – 0.25
LOQ (mg/kg flesh matrix)	0.10	0.05
LOQ (mg/kg fruit matrix)	0.26	0.13
LOQ (mg/kg peel matrix)	0.50 – 1.00	0.26 – 0.50

Figure A.2: Validation of the method for quantifying triterpenoids by HPTLC-UV-Visible

A- Peel extracts in acetonitrile (a, b, c) and purified extract (d):



B- Peel extracts from VAR1 in acetonitrile: non oxidized (1) and oxidized (2)

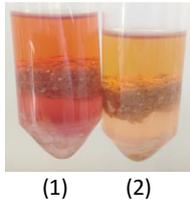


Figure A.3: QuEChERS extracts of apple peel

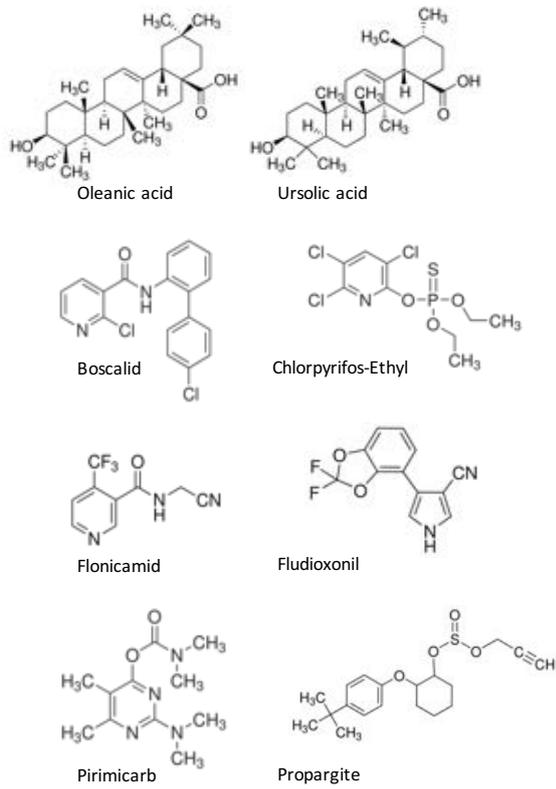


Figure A.4: Triterpenic acid and pesticide molecules

ACKNOWLEDGMENTS

This work was undertaken within the framework of a FUI project, INNOPOM, funded by *BPI France* and the *Conseil Régional Midi-Pyrénées*.

4. Conclusion

Nous avons développé avec succès une méthode multi-résidus afin de déterminer les quantités de résidus dans des pommes. Cette méthode est basée sur l'utilisation de la technique d'extraction QuEChERS suivie d'une analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse tandem trappe d'ions (CPG/SM²). La spectrométrie de masse tandem est un outil puissant d'identification des molécules de phytosanitaires dans des matrices complexes. Sa sélectivité importante permet de différencier les analytes cibles à l'état de traces des composés co-extraits de la matrice qui pourraient interférer. Néanmoins, ces interférences ne peuvent pas être totalement éliminées et il arrive fréquemment que les résultats de quantification soient surestimés ou sous-estimés.

Dans notre étude, nous avons mis en évidence que les molécules de phytosanitaires subissent un effet matrice fortement positif dans des extraits de chair et de fruit entier. Nous avons démontré que ces résultats ne sont pas dépendants de la variété. Dans le cas des extraits d'épiderme, les effets matrice sont au contraire négatifs et, même s'il n'a pas été établi de corrélation significative avec la variété, nous avons noté que les effets matrice dans les extraits d'épiderme de pommes Gala tendent vers des valeurs positives dans le cas de certains phytosanitaires. Nous avons conclu que la nature et la concentration des analytes matrice co-extraits dans les épidermes des trois variétés pourraient expliquer ces résultats.

La normalisation des réponses analytiques des molécules de phytosanitaires avec un étalon interne tend à réduire considérablement les valeurs des effets matrice et à minimiser la variabilité des valeurs d'un pesticide à l'autre. Néanmoins, ces effets dans les extraits d'épiderme sont persistants et sans protection des analytes, la sensibilité de détection peut en être affectée.

Nous avons choisi d'analyser les résidus de phytosanitaires dans des extraits d'épiderme bien que les LMR officielles soient relatives aux teneurs dans les fruits entiers. Dans les extraits d'épiderme, les concentrations analysées sont la plupart du temps supérieures aux LQ des appareils de mesure. Concernant les extraits de fruit entier, quel que soit l'échantillon analysé, les concentrations en phytosanitaires résiduels sont toujours nettement inférieures aux LMR. L'analyse des résidus dans les épidermes des trois variétés a mis en évidence la présence de molécules de phytosanitaires supplémentaires, révélant ainsi un nombre de résidus plus exhaustif. Dans le cas où l'analyse de résidus dans les épidermes est recherché, un étalonnage dans la matrice permet de compenser en grande partie les effets matrice observés, sans s'affranchir de la présence des analytes co-extraits qui provoquent une suppression du signal analytique des phytosanitaires en raison d'effets matrice négatifs.

La purification des extraits d'épiderme doit permettre d'augmenter la sensibilité de détection en éliminant le nombre d'analytes co-extraits. Une analyse par CCMHP des différents extraits de pommes a conduit à l'identification de marqueurs moléculaires représentatifs de chaque type de matrice. En particulier, les extraits d'épiderme sont caractérisés par des teneurs relativement élevées en acides oléanolique et ursolique (10-25 mg/kg). Nous avons mis en évidence une relation entre les effets matrice négatifs observés en CPG/SM² et la concentration de ces deux acides triterpéniques. Le boscalid et le fludioxonil sont particulièrement affectés par la présence des acides, de par leur caractère plus basique en phase gazeuse (nature de l'azote protonable et des substituants mis en jeu

dans la stabilisation des charges de l'espèce protonée) que celui du flonicamid, du pirimicarb, du chlorpyrifos et de la propargite.

Afin d'éliminer la présence des acides triterpéniques dans des extraits concentrés d'épiderme de pommes, nous proposons une méthode de purification par CCMHP. Dans cette méthode, les molécules de phytosanitaires sont co-élus mais séparés de la plupart des composés matrices identifiés, et en particuliers des acides oléanolique et ursolique. La combinaison de cette méthode avec une interface TLC/MS pourrait conduire à une purification avancée des extraits QuEChERS dans le cas de nos échantillons avant l'injection en CPG. Elle peut également être transposée pour une purification des extraits par chromatographie sur colonne ou par chromatographie flash

Références bibliographiques

- [1] F. Bro-Rasmussen, Contamination by persistent chemicals in food chain and human health, *Sci. Total Environ.* 188 (1996) S45–S60. doi:10.1016/0048-9697(96)05276-X.
- [2] Off. J. Eur. Union, Regulation (EC) No. 396/2005 of the European parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or food and feed of plant and animal origin amending Council Directive 91/414/EEC, (2005). <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32005R0396> (consulté le 20 Août 2016).
- [3] Ż. Bargańska, M. Ślebioda, J. Namieśnik, Pesticide residues levels in honey from apiaries located of Northern Poland, *Food Control.* 31 (2013) 196–201. doi:10.1016/j.foodcont.2012.09.049.
- [4] P. Georgakopoulos, R. Zachari, M. Mataragas, P. Athanasopoulos, E.H. Drosinos, P.N. Skandamis, Optimisation of octadecyl (C18) sorbent amount in QuEChERS analytical method for the accurate organophosphorus pesticide residues determination in low-fatty baby foods with response surface methodology, *Food Chem.* 128 (2011) 536–542. doi:10.1016/j.foodchem.2011.03.042.
- [5] I.-S. Jeong, B.-M. Kwak, J.-H. Ahn, S.-H. Jeong, Determination of pesticide residues in milk using a QuEChERS-based method developed by response surface methodology, *Food Chem.* 133 (2012) 473–481. doi:10.1016/j.foodchem.2012.01.004.
- [6] X. Hou, M. Han, X. Dai, X. Yang, S. Yi, A multi-residue method for the determination of 124 pesticides in rice by modified QuEChERS extraction and gas chromatography–tandem mass spectrometry, *Food Chem.* 138 (2013) 1198–1205. doi:10.1016/j.foodchem.2012.11.089.
- [7] C. Lesueur, P. Knittl, M. Gartner, A. Mentler, M. Fuerhacker, Analysis of 140 pesticides from conventional farming foodstuff samples after extraction with the modified QuEChERS method, *Food Control.* 19 (2008) 906–914. doi:10.1016/j.foodcont.2007.09.002.
- [8] D. Lu, X. Qiu, C. Feng, Y. Jin, Y. Lin, L. Xiong, Y. Wen, D. Wang, G. Wang, Simultaneous determination of 45 pesticides in fruit and vegetable using an improved QuEChERS method and on-line gel permeation chromatography–gas chromatography/mass spectrometer, *J. Chromatogr. B.* 895–896 (2012) 17–24. doi:10.1016/j.jchromb.2012.03.006.
- [9] N. Omar, J. Bakar, K. Muhammad, Determination of organochlorine pesticides in shrimp by gas chromatography–mass spectrometry using a modified QuEChERS approach, *Food Control.* 34 (2013) 318–322. doi:10.1016/j.foodcont.2013.04.029.
- [10] F. Zhang, L. Wang, L. Zhou, D. Wu, H. Pan, C. Pan, Residue dynamics of pyraclostrobin in peanut and field soil by QuEChERS and LC-MS/MS, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 78 (2012) 116–122. doi:10.1016/j.ecoenv.2011.11.003.
- [11] S.N. Sinha, M.V.V. Rao, K. Vasudev, M. Odetokun, A liquid chromatography mass spectrometry-based method to measure organophosphorous insecticide, herbicide and non-organophosphorous pesticide in grape and apple samples, *Food Control.* 25 (2012) 636–646.
- [12] R.P.Z. Furlani, K.M. Marcilio, F.M. Leme, S.A.V. Tfouni, Analysis of pesticide residues in sugarcane juice using QuEChERS sample preparation and gas chromatography with electron capture detection, *Food Chem.* 126 (2011) 1283–1287. doi:10.1016/j.foodchem.2010.11.074.
- [13] A. Balinova, R. Mladenova, D. Shtereva, Solid-phase extraction on sorbents of different

retention mechanisms followed by determination by gas chromatography–mass spectrometric and gas chromatography–electron capture detection of pesticide residues in crops, *J. Chromatogr. A.* 1150 (2007) 136–144. doi:10.1016/j.chroma.2007.02.002.

[14] L.B. Abdulra'uf, G.H. Tan, Multivariate study of parameters in the determination of pesticide residues in apple by headspace solid phase microextraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry using experimental factorial design, *Food Chem.* 141 (2013) 4344–4348. doi:10.1016/j.foodchem.2013.07.022.

[15] C. Chen, Y. Qian, Q. Chen, C. Tao, C. Li, Y. Li, Evaluation of pesticide residues in fruits and vegetables from Xiamen, China, *Food Control.* 22 (2011) 1114–1120. doi:10.1016/j.foodcont.2011.01.007.

[16] S.C. Cunha, J.O. Fernandes, Multipesticide residue analysis in maize combining acetonitrile-based extraction with dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 7748–7757. doi:10.1016/j.chroma.2011.08.066.

[17] L. Cherta, T. Portolés, J. Beltran, E. Pitarch, J.G.J. Mol, F. Hernández, Application of gas chromatography–(triple quadrupole) mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization for the determination of multiclass pesticides in fruits and vegetables, *J. Chromatogr. A.* 1314 (2013) 224–240. doi:10.1016/j.chroma.2013.09.029.

[18] J. Martins, C. Esteves, A. Limpo-Faria, P. Barros, N. Ribeiro, T. Simões, M. Correia, C. Delerue-Matos, Analysis of six fungicides and one acaricide in still and fortified wines using solid-phase microextraction-gas chromatography/tandem mass spectrometry, *Food Chem.* 132 (2012) 630–636. doi:10.1016/j.foodchem.2011.10.102.

[19] Y. Fillatre, D. Rondeau, B. Bonnet, A. Daguin, A. Jadas-Hecart, P.-Y. Communal, Multiresidue Analysis of Multiclass Pesticides in Lavandin Essential Oil by LC/MS/MS Using the Scheduled Selected Reaction Monitoring Mode, *Anal. Chem.* 83 (2011) 109–117.

[20] M.I. Cervera, C. Medina, T. Portolés, E. Pitarch, J. Beltrán, E. Serrahima, L. Pineda, G. Muñoz, F. Centrich, F. Hernández, Multi-residue determination of 130 multiclass pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 2873–2891. doi:10.1007/s00216-010-3597-8.

[21] S.C. Cunha, J.O. Fernandes, M.B.P.P. Oliveira, Fast analysis of multiple pesticide residues in apple juice using dispersive liquid-liquid microextraction and multidimensional gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 8835–8844. doi:10.1016/j.chroma.2009.10.051.

[22] D. Štajnbaher, L. Zupančič-Kralj, Optimisation of programmable temperature vaporizer-based large volume injection for determination of pesticide residues in fruits and vegetables using gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1190 (2008) 316–326. doi:10.1016/j.chroma.2008.03.002.

[23] C.F. Poole, Matrix-induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1158 (2007) 241–250. doi:10.1016/j.chroma.2007.01.018.

[24] NF EN 15662 : Aliments d'origine végétale - Méthode polyvalente de détermination des résidus des pesticides par CG-SM et SL/SM/SM avec extraction/partition avec de l'acétonitrile et nettoyage par SPE dispersés (2009).

- [25] M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Stajnbaher, F.J. Schenck, 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.* 86 (2003) 412–431.
- [26] H. Kwon, S.J. Lehotay, L. Geis-Asteggiane, Variability of matrix effects in liquid and gas chromatography–mass spectrometry analysis of pesticide residues after QuEChERS sample preparation of different food crops, *J. Chromatogr. A.* 1270 (2012) 235–245. doi:10.1016/j.chroma.2012.10.059.
- [27] G.C.R.M. Andrade, R.M.O. Freguglia, R.P.Z. Furlani, N.H. Torres, V.L. Tornisiello, Determination of pesticide residues in tomato using dispersive solid-phase extraction and gas chromatography/ion trap mass spectrometry, *J. Braz. Chem. Soc.* 22 (2011) 1701–1708. doi:10.1590/S0103-50532011000900012.
- [28] K. Banerjee, S. Mujawar, S.C. Utture, S. Dasgupta, P.G. Adsule, Optimization of gas chromatography–single quadrupole mass spectrometry conditions for multiresidue analysis of pesticides in grapes in compliance to EU-MRLs, *Food Chem.* 138 (2013) 600–607. doi:10.1016/j.foodchem.2012.10.105.
- [29] J. Hajslova, J. Zrostlikova, Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices, *J. Chromatogr. A.* (2003) 181–197. doi:10.1016/S0021-9673(03)00539-9.
- [30] Y. Wang, H.-Y. Jin, S.-C. Ma, J. Lu, R.-C. Lin, Determination of 195 pesticide residues in Chinese herbs by gas chromatography–mass spectrometry using analyte protectants, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 334–342.
- [31] F.A. de Sousa, A.I. Guido Costa, M.E.L.R. de Queiroz, R.F. Teófilo, A.A. Neves, G.P. de Pinho, Evaluation of matrix effect on the GC response of eleven pesticides by PCA, *Food Chem.* 135 (2012) 179–185. doi:10.1016/j.foodchem.2012.04.063.
- [32] J. Kowalski, M. Misselwitz, J. Cochran, Investigation of matrix compounds responsible for enhanced degradation of organochlorine, organophosphorus, organonitrogen, and carbamate pesticides during hot GC splitless injection of QuEChERS extracts of Canola seed, (2013). 6th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis RAFA, 5-8 Novembre 2013, Prague, République Tchèque. Book of Abstracts consultable sur <http://www.rafa2013.eu/BoA.html>.
- [33] M. Colin-Henrion, De la pomme à la pomme transformée : impact du procédé sur deux composés d’intérêt nutritionnel. Caractérisation physique et sensorielle des produits transformés, thèse de doctorat, Université d’Angers (2008).
- [34] A. Szakiel, C. Paczkowski, F. Pensec, C. Bertsch, Fruit cuticular waxes as a source of biologically active triterpenoids, *Phytochem. Rev.* 11 (2012) 263–284.
- [35] R.D. Belding, S.M. Blankenship, E. Young, R.B. Leidy, Composition and variability of epicuticular waxes in apple cultivars, *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 123 (1998) 348–356.
- [36] M. Riedel, A. Eichner, R. Jetter, Slippery surfaces of carnivorous plants: composition of epicuticular wax crystals in *Nepenthes alata* Blanco pitchers, *Planta.* 218 (2003) 87–97.
- [37] M. Riedel, A. Eichner, H. Meimberg, R. Jetter, Chemical composition of epicuticular wax crystals on the slippery zone in pitchers of five *Nepenthes species* and hybrids, *Planta.* 225 (2007) 1517–1534.

- [38] SANCO/12571/2013., Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. European commission Health & Consumer Protection, (2015). http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/guidance_documents/docs/qualcontrol_en.pdf (consulté le 30 Janvier 2015).
- [39] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC–MS/MS, *Anal. Chem.* 75 (2003) 3019–3030. doi:10.1021/ac020361s.
- [40] J. Hajslova, T. Cajka, Gas chromatography in food analysis, in: *Handb. Food Anal. Instrum.*, Taylor & Francis Group, LLC (2008).
- [41] L. Silvestro, I. Tarcomnicu, S. Rizea, Matrix Effects in Mass Spectrometry Combined with Separation Methods — Comparison HPLC, GC and Discussion on Methods to Control these Effects, in: A.V. Coelho (Ed.), *Tandem Mass Spectrom. - Mol. Charact.*, InTech (2013). <http://www.intechopen.com/books/tandem-mass-spectrometry-molecular-characterization/matrix-effects-in-mass-spectrometry-combined-with-separation-methods-comparison-hplc-gc-and-discussi> (consulté le 20 Mars 2016).
- [42] G. Giacinti, C. Raynaud, S. Capblancq, V. Simon, Matrix-Matching as an Improvement Strategy for the Detection of Pesticide Residues, *J. Food Sci.* 81 (2016) 1342–1350. doi:10.1111/1750-3841.13296.
- [43] V.P. Shah, K.K. Midha, J.W.A. Findlay, H.M. Hill, J.D. Hulse, I.J. McGilveray, G. McKay, K.J. Miller, R.N. Patnaik, M.L. Powell, A. Tonelli, C.T. Viswanathan, A. Yacobi, Bioanalytical Method Validation—A Revisit with a Decade of Progress, *Pharm. Res.* 17 (2000) 1551–1557. doi:10.1023/A:1007669411738.
- [44] D. Steiniger, J. Butler, E. Phillips, Multi-residue pesticide analysis in rice by a modified QuEChERS extraction and ion trap GC/MSn analysis, Technical note : 10239, ThermoFischer (2009). <https://www.thermofisher.com/content/dam/tfs/ATG/CMD/cmd-support/itq/scientific-resources/application-notes/Multi-residue-Pesticide-Analysis-in-Rice-by-a-Modified-QuEChERS-Extraction-and-Ion-Trap-GC-MSn-Analysis.pdf> (consulté le 05 Juillet 2016).
- [45] D. Shelly, C.A. Perman, Multiresidue analysis of cereal grains using a modified QuEChERS method with GC-TOFMS and UPLC-MS/MS techniques, *Trade Publ.* (2010) 34.
- [46] D. Paradis, Méthode d'analyse dans le miel de trois familles d'insecticides (nicotinoïdes, pyréthrinoïdes et pyrazoles) par chromatographies en phase gazeuse et en phase liquide couplées à la spectrométrie de masse en tandem : application à l'étude de contamination de ruches, thèse de doctorat, Université de Aix-Marseille (2012). <http://www.theses.fr/2012AIXM4058> (consulté le 05 Juillet 2016).
- [47] A. Wilkowska, M. Biziuk, Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology, *Food Chem.* 125 (2011) 803–812. doi:10.1016/j.foodchem.2010.09.094.
- [48] J. Fenik, M. Tankiewicz, M. Biziuk, Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables, *TrAC Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 814–826. doi:10.1016/j.trac.2011.02.008.
- [49] J.A.C. Guedes, R. de O. Silva, C.G. Lima, M.A.L. Milhome, R.F. do Nascimento, Matrix effect in guava multiresidue analysis by QuEChERS method and gas chromatography coupled to quadrupole

mass spectrometry, *Food Chem.* 199 (2016) 380–386. doi:10.1016/j.foodchem.2015.12.007.

[50] K. Grob, *Split and splitless injection in capillary GC (with some remarks on PTV injection)*, 3rd edition, Wiley-VCH Verlag GmbH (1993).

[51] J.A. Marlett, N.W. Vollendorf, Dietary fiber content and composition of different forms of fruits, *Food Chem.* 51 (1994) 39–44. doi:10.1016/0308-8146(94)90045-0.

[52] P. Massiot, A. Baron, J.F. Drilleau, Characterisation and enzymatic hydrolysis of cell-wall polysaccharides from different tissue zones of apple, *Carbohydr. Polym.* 25 (1994) 145–154. doi:10.1016/0144-8617(94)90198-8.

[53] I. Travers, *Influence des conditions pédoclimatiques du terroir sur le comportement du pommier et la composition des pommes à cidre dans le Pays d’Auge*, thèse de doctorat, Université de Caen (2002).

[54] J. Wu, H. Gao, L. Zhao, X. Liao, F. Chen, Z. Wang, X. Hu, Chemical compositional characterization of some apple cultivars, *Food Chem.* 103 (2007) 88–93.

[55] G. Campeanu, G. Neata, G. Darjanschi, Chemical Composition of the Fruits of Several Apple Cultivars Growth as Biological Crop, *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca.* 37 (2009) 161–164.

[56] C. Verdu, *Cartographie génétique des composés phénoliques de la pomme*, thèse de doctorat, Université de Nantes Angers Le Mans (2013).

[57] R. Veberic, M. Trobec, K. Herbinger, M. Hofer, D. Grill, F. Stampar, Phenolic compounds in some apple (*Malus domestica* Borkh) cultivars of organic and integrated production, *J. Sci. Food Agric.* (2005) 1687–1694.

[58] T. Dugé de Bernonville, *Caractérisations histologique, moléculaire et biochimique des interactions compatible et incompatible entre *Erwinia amylovora*, agent du feu bactérien, et le pommier (*Malus x domestica*)*, thèse de doctorat, Université d’Angers, 2009.

[59] G. Bonnier, *Revue Générale de Botanique*, Librairie Générale de l’Enseignement, tome 70, N°831-832, La cire cuticulaire des pommes (*Pirus malus* L.) (Etude morphologique, biochimique et physiologique) par P. Mazliak (1963).

[60] A.M.S. Fernandes, E.A. Baker, J.T. Martin, Studies on plant cuticle, *Ann. Appl. Biol.* 53 (1964) 43–58. doi:10.1111/j.1744-7348.1964.tb03779.x.

[61] P.E. Kolattukudi, Natural Waxes on Fruit, *Inst. Biol. Chem. Wash. State Univ. Pullman.* 2 (1984) 3–7.

[62] J.-P. Garrec, C. Henry, L. Le Maout, Cires épi- et intracuticulaires: Etude de leur séparation, de leurs caractéristiques chimiques et de leurs rôles respectifs dans la perméabilité cuticulaire, *Environ. Exp. Bot.* 35 (1995) 399–409.

[63] T. Shepherd, D.W. Griffiths, The effects of stress on plant cuticular waxes, *New Phytol.* 171 (2006) 469–499.

[64] C. Buschhaus, R. Jetter, Composition differences between epicuticular and intracuticular wax substructures: How do plants seal their epidermal surfaces?, *J. Exp. Bot.* 62 (2011) 841–853.

[65] X. Dong, J. Rao, D.J. Huber, X. Chang, F. Xin, Wax composition of “Red Fuji” apple fruit during development and during storage after 1-methylcyclopropene treatment, *Hortic. Environ. Biotechnol.*

53 (2012) 288–297. doi:10.1007/s13580-012-0036-0.

[66] G. Bianchi, Plant waxes, in: *Waxes Chem. Mol. Biol. Funct.*, The Oily Press, Glasgow, (1995) 175–222.

[67] T.K. McGhie, S. Hudault, R.C.M. Lunken, J.T. Christeller, Apple Peels, from Seven Cultivars, Have Lipase-Inhibitory Activity and Contain Numerous Ursenoic Acids As Identified by LC-ESI-QTOF-HRMS, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 482–491.

[68] C. Bérangère, N. Caussarieu, P. Morin, L. Morin-Allory, M. Lafosse, Rapid analysis of triterpenic acids by liquid chromatography using porous graphitic carbon and evaporative light scattering detection, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 964–970. doi:10.1002/jssc.200401764.

[69] C. Oellig, W. Schwack, Planar solid phase extraction-A new clean-up concept in multi-residue analysis of pesticides by liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 6540–6547.

[70] V.L. Singleton, J.A. Rossi, Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents, *Am. J. Enol. Vitic.* 16 (1965) 144–158.

[71] N.P. Morozova, E.G. Sal'kova, Study of the composition of apple cuticle, *Prikl. Biokhimiya Mikrobiol.* 2 (1966) 232–238.

[72] M.A. Awad, A. de Jager, L.M. van Westing, Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: characterisation of variation, *Sci. Hortic.* 83 (2000) 249–263. doi:10.1016/S0304-4238(99)00124-7.

[73] D.R. Erney, A.M. Gillespie, D.M. Gilvydis, C.F. Poole, Explanation of the matrix-induced chromatographic response enhancement of organophosphorus pesticides during open tubular column gas chromatography with splitless or hot on-column injection and flame photometric detection, *J. Chromatogr. A.* 638 (1993) 57–63. doi:10.1016/0021-9673(93)85007-T.

[74] C R Moylan, and J.I. Brauman, Gas Phase Acid-Base Chemistry, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 34 (1983) 187–215. doi:10.1146/annurev.pc.34.100183.001155.

[75] R. Shimshi, X. Wang, R.J. Cross, M. Saunders, Dynamics of the Gas-Phase Acid-Base Reaction, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 9756–9759. doi:10.1021/ja00143a020.

[76] G. Bouchoux, Gas-phase basicities of polyfunctional molecules. Part 1: Theory and methods, *Mass Spectrom. Rev.* 26 (2007) 775–835. doi:10.1002/mas.20151.

[77] E.D. Raczyńska, J.-F. Gal, P.-C. Maria, Enhanced Basicity of Push–Pull Nitrogen Bases in the Gas Phase, *Chem. Rev.* (2016). doi:10.1021/acs.chemrev.6b00224.

[78] G. Bouchoux, M. Eckert-Maksic, Gas phase basicities of polyfunctional molecules. Part 5: Non-aromatic sp² nitrogen containing compounds, *Mass Spectrom. Rev.* (2016). doi:10.1002/mas.21511.

CHAPITRE IV

*Interactions plastifiants -
phytosanitaires - cuticule.
Procédé industriel de
décontamination.*

Chapitre IV Etude des interactions plastifiants-phytosanitaires-cuticule. Mise au point d'un procédé industriel de décontamination des pommes avant commercialisation

Mots-clés : pomme, intrants, résidus, plastifiants, décontamination, procédé

Résumé :

Les intrants à caractère hydrophobe se répartissent dans l'épaisseur de la cuticule de façon inhomogène, non seulement en raison de l'hétérogénéité de l'épiderme mais également parce qu'ils sont l'objet de différentes réactions physico-chimiques (métabolisation, volatilisation, photodégradation...). C'est le cas en particulier des molécules de phytosanitaires. Tous les contaminants se comportent différemment dans la cuticule selon leur taille, la nature de leurs substituants et leurs propriétés physico-chimiques telles que la lipophilicité. Ils pénètrent à des vitesses et des taux variables et se localisent dans divers environnements de la cuticule. Plus le contaminant sera lié à celle-ci par des interactions fortes ou parce qu'il aura pénétré plus profondément, plus son extraction sera difficile. La mise au point d'un procédé industrialisable de décontamination des pommes passe par la levée de ces verrous. Deux paramètres s'avèrent cruciaux pour l'obtention de pommes « zéro résidu » détectable, qui dépend également de la nature des agents de décontamination et de leur concentration : (i) le facteur temps qui contribue à optimiser les phases de sorption et de diffusion des agents dans la cuticule ainsi que la solvataion des contaminants, et (ii) l'élimination du complexe agent - contaminant.

1. Introduction

L'extraction d'un contaminant hydrophobe dans la pomme nécessite la mise en œuvre d'un agent pénétrant et diffusant (vecteur) dans la cuticule afin que les équilibres agent-contaminant s'organisent au détriment des équilibres contaminant-cuticule et agent-cuticule, dans le but de pouvoir éliminer le complexe agent-contaminant. Des étapes limitantes peuvent survenir selon la nature du contaminant et de l'agent de décontamination.

Le chef d'orchestre de cet ensemble de molécules reste la cuticule. Son hétérogénéité chimique et structurale régit les mouvements de molécules et de solvant selon une tortuosité spécifique à l'espèce végétale.

La mise au point d'un procédé industriel de traitement des résidus phytosanitaires dans les trois variétés de pommes étudiées a nécessité plusieurs phases de travail :

- une phase préliminaire d'évaluation d'agents de décontamination,
- la mise en place d'essais sur fruits sur pilote laboratoire,
- la mise au point de formulations à base de plastifiants actifs,
- le transfert à l'échelle pilote pré-industriel.

Lors de l'étape préliminaire, l'efficacité de divers adsorbants solides, filmogènes et agents de vectorisation (plastifiants actifs) a été évaluée. Il s'agit d'une phase de modélisation dont le but est d'identifier les meilleurs agents et les processus d'interaction agent-phytosanitaire en fonction des interactions phytosanitaires-cuticule évaluées dans le chapitre II. Notons que les contraintes industrielles en termes de temps et de température, liées respectivement au rendement de productivité et à la qualité sanitaire et organoleptique des pommes n'autorisent qu'une faible fenêtre de variation pour ces deux variables. En conséquence, les paramètres temps et température ont été fixés arbitrairement lors des évaluations des différents agents chimiques de décontamination. Une première approche des interactions contaminants-cuticule et agent-contaminants-cuticule est discutée.

Dans notre étude, les interactions ont été modélisées grâce à la théorie de la solubilité de Hansen. Associée aux volumes molaires des différents solvants et molécules en interaction, elle permet une approche claire et simplifiée des transferts et équilibres entre les matières au sein du biopolymère qu'est la cuticule. Les paramètres de solubilité de Hansen couplés à une étude de la dynamique du fludioxonil dans des cuticules de pomme en présence des agents par RMN ^{13}C et ^{19}F du solide sont utilisés pour proposer un schéma de décontamination par sorption-diffusion-désorption de ces agents.

Dans un second temps, des essais sur un pilote laboratoire ont permis de mieux appréhender les verrous technologiques. Les meilleurs agents de la phase préliminaire ont été testés à l'échelle du fruit, dans des conditions maîtrisées de contamination.

Enfin, des essais expérimentaux sur un procédé pré-industriel installé en station fruitière, mettant en œuvre deux plastifiants et trois solvants, ont pu être réalisés en conditions réelles sur des pommes de la variété 2 en sortie de pré-calibrage. Un schéma d'extraction des résidus dans la cuticule des pommes est proposé, se fondant sur les théories de Hansen et de Hildebrand-Scatchard, ainsi que sur la base de toutes les observations antérieures et les paramètres physico-chimiques qui gèrent les équilibres de sorption et diffusion. Les conditions d'obtention de fruits avec zéro résidu détectable sont discutées.

2. Matériels et méthodes

2. 1. Sélection des variétés de pommes

Les trois variétés de pommes utilisées dans cette étude et dénommées ci-après VAR1, VAR2 et VAR3 ont été sélectionnées pour leur différentes caractéristiques : saisons de récolte différentes (Août, Octobre et Novembre respectivement), composition chimique et organisation structurale variables (Cf. chapitre II). Elles sont aussi représentatives des goûts des consommateurs en France et figurent parmi les meilleures ventes locales et nationales.

2. 2. Sélection des résidus phytosanitaires pour le suivi analytique

BLUE WHALE a mis en place en 2011-2012 une campagne de prélèvements/analyses afin de connaître « le niveau de contamination » des pommes. Quatre-vingt-sept molécules actives ont pu être dosées. Ces résultats ont permis de sélectionner au démarrage de la thèse en Août 2012 dans le cadre du projet INNO'POM, 12 pesticides parmi les plus utilisés (Tableau IV-1). Par la suite, la propargite a été interdite à partir de décembre 2012.

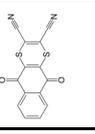
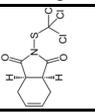
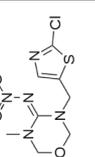
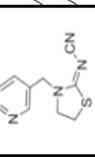
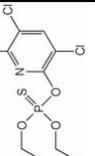
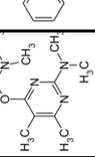
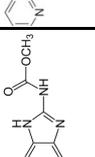
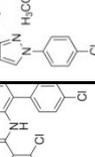
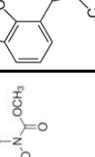
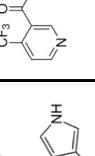
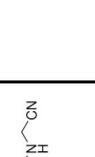
Composé	Dithianon	Captane	Thiamethoxam	Thiaclopride	Chlorpyrifos-Et	Pirimicarbe	Carbendazime	Boscalid	Pyraclostrobine	Fludioxonil	Fonicamid
Classe	Organo-azotés soufrés	Organo-azotés chlorés soufrés	Organo-azotés chlorés soufrés	Organo-azotés chlorés soufrés phosphorés	Organo-azotés chlorés soufrés phosphorés	Organo-azotés	Organo-azotés	Organo-azotés chlorés	Organo-azotés fluorés	Organo-azotés fluorés	Organo-azotés fluorés
Cible	Fongicide hors conservation	Insecticide	Insecticide-acaricide	Insecticide-acaricide	Insecticide-acaricide	Fongicide conservation	Fongicide conservation	Fongicide conservation	Fongicide conservation	Fongicide conservation	Insecticide-aplicide
Formule											
Masse moléculaire (g/mol)	296,32	300,59	291,71	252,72	350,59	238,29	191,59	343,21	387,82	248,19	229,16
LogK _{ow}	3,32	2,50	-0,13	1,26	4,7	1,70	1,48	2,96	3,99	4,12	-0,24
Nom commercial	Delan WG	Sigma DG ¹	Actara	Calypso	Pyrinex ME	Pirimor G	Topsin 70WG ²	Bellis	Geoxe	Geoxe	Teppeki
Concentration d'application	70%	80%	250g/kg	480g/L	250g/L	500g/kg	70,40%	252g/kg	128g/kg	50%	500g/kg
Autres composés identifiés	Kaolin	Non identifiés	Non identifiés	Non identifiés	Non identifiés	1,4-bis(2-ethylhexyl)-sulfo-butanedioate de sodium	Alkyl-naphthalène sulfonate de sodium	Alkyl-naphthalène sulfonate de sodium, formaldéhyde	Naphthalène sulfonate de sodium, polymère avec formaldéhyde	Naphthalène sulfonate de sodium, polymère avec formaldéhyde	Non identifiés
	Sulfate d'ammonium							Mélange d'alkyl-naphthalène de sodium	Alkyl-naphthalène sulfonate de sodium, polymère avec formaldéhyde	2-[méthyl(1-oxo-9-octadecenyl)amino]-ethanesulfonate	
								Sulfate d'ammonium			
								Gel de silice			
								Acide lignosulfonique, sel de sodium			
								Kaolin			
								Sulfate de sodium			

Tableau IV-1 : Sélection des 11 phytosanitaires identifiés dans les pommes du Sud-Ouest de la France.
Légende : ¹Trois autres produits sont autorisés : Merpan 80WDG (80 %), Merpan SC (480 g/L) ou Cap 83 (83 %)
²La carbendazime est le métabolite du thiophanate de méthyle

2. 3. Mise en œuvre des supports adsorbants solides

2. 3. 1. Sélection des supports adsorbants

Les supports adsorbants sélectionnés pour l'étude, listés et codés dans le Tableau IV-2, sont tous de grade alimentaire et figurent dans le *Codex Alimentarius*. Ils ne sont pas solubles en phase aqueuse.

Classe	Nature	Code
Origine minérale	Résine Amberlite XAD7HP (Rohm & Haas)	M1
	Résine Amberlite FPX66 (Rohm & Haas)	M2
	Charbon actif Norit GAC 1240W (Sigma Aldrich)	M3
	Charbon actif SX (Sigma Aldrich)	M4
	Bentonite Electra (Martin Vialatte SAS Sofralab)	M5
Origine organique	Amidon (Roquettes)	O1
	Chitosan middle viscous 28191 (Fluka Analytical)	O2
	Protéines de pois (Roquettes)	O3
	Protéines de soja (Roquettes)	O4

Tableau IV-2 : Sélection des supports adsorbants solides

2. 3. 2. Principe de la modélisation de l'adsorption des phytosanitaires en phase aqueuse

Les supports adsorbants ainsi que 30 mL de chaque solution aqueuse de phytosanitaire sont introduits dans des tubes à centrifuger de 50 mL. Deux séries d'essais (n = 2 réplicats), correspondant à des ratios massiques croissants, sont effectuées comme indiqué dans le Tableau IV-3.

Essai	Produit	Phytosanitaire	DH (mg/L)	Teneur %	V (mL)	Q (mg)	Adsorbants								
							Résines			Charbons, protéines, amidon, bentonite			Chitosan		
							Masse (mg)	Ratio m/vol	Ratio massique	Masse (mg)	Ratio m/vol	Ratio massique	Masse (mg)	Ratio vol	Ratio massique
1	BELLIS	Boscalid	800	12.8	30	3.06	3000	1:10	1:1000	1500	1:20	1:500	600	1:50	1:200
		Pyraclostrobin	25.2	30	6.06	1:500			1:250			1:100			
	GEOXE	Fludioxonil	400	50	30	6	3000	1:10	1:500	1500	1:20	1:250	600	1:50	1:100
	PYRINEX	Chlorpyrifos-Et	500	100	30	15	3000	1:10	1:200	1500	1:20	1:500	6000*	1:16	1:400
TEPPEKI	Fonicamid	140	50	30	2.1	3000	1:10	1:500	1500	1:20	1:750	600	1:50	1:300	
2	BELLIS	Boscalid	800	12.8	30	3.06	1200	1:25	1:400	150	1:200	1:50	240	1:125	1:80
		Pyraclostrobin	25.2	30	6.06	1:200			1:25			1:40			
	GEOXE	Fludioxonil	400	50	30	6	1200	1:25	1:200	150	1:200	1:25	240	1:125	1:40
	PYRINEX	Chlorpyrifos-Et	500	100	30	15	nr			150	1:200	1:50	600	1:50	1:40
TEPPEKI	Fonicamid	140	50	30	2.1	420	1:71	1:200	150	1:200	1:75	80	1:400	1:40	

Tableau IV-3 : Ratios support adsorbant solide / phytosanitaires

Légende : DH = dose homologue,

V = volume de solution de traitement,

Q = quantité de matière active dans V,

Ratio m/vol = masse support adsorbant / volume total à traiter soit la masse (densité équivalente à 1),

Ratio massique = masse de phytosanitaire à traiter / masse de support adsorbant,

* V = 100 mL,

nr = non réalisés

Les solutions sont mélangées pendant une heure sous agitation orbitale (100 tours/min) à $21 \pm 0,5^\circ\text{C}$ puis centrifugées pendant 10 minutes à 3000 G à $17 \pm 1^\circ\text{C}$. La phase aqueuse est entièrement prélevée tandis que les adsorbants sont aliquotés pour être congelés.

Les phytosanitaires restants dans les phases aqueuses sont extraits par 10mL d'acétate d'éthyle sous agitation orbitale (100 tours/min) pendant 5 minutes à $21 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Après extraction, les tubes sont centrifugés pendant 10 minutes à 3000 G à $17 \pm 1^\circ\text{C}$ afin de séparer les phases. Dans certains cas (O2, O3 et O4), une émulsion très stable peut survenir et résiste à la centrifugation. Un ajout de

quelques millilitres de méthanol permet de casser au maximum l'émulsion à l'interface et de récupérer la majorité de la phase acétate d'éthyle.

Les phases organiques (+ 40 µL de dodécane qui permet d'éviter les pertes de phytosanitaires lors de l'évaporation sous vide) sont intégralement récupérées et évaporées à sec sous vide au Multivapor P-12 (Büchi) à + 40°C. L'extrait sec est repris dans 500 µL d'i-octane. 100 µL d'extrait est mélangé avec 50 µL de TDCPP à 597 ng/µL dans l'i-octane (IS). 1 µL du mélange est injecté directement dans un chromatographe en phase gazeuse couplé à un détecteur à ionisation de flamme CPG/DIF (Cf. paramètres § 2. 3. 5.).

2. 3. 3. Vérification des quantités de matières actives dans les formulations commerciales de pesticides

Afin d'évaluer la quantité d'actif présente dans chaque formule commerciale, ces dernières sont solubilisées entre 0,15 et 1,2 g/L dans l'acétate d'éthyle. 100µL de chaque solution sont mélangés à 50 µL de TDCPP à 597 ng/µL et 1 µL du mélange est injecté en CPG/DIF (n = 5) (Cf. paramètres § 2. 3. 5.).

Les teneurs expérimentales en molécules actives sont dans la plupart des cas significativement plus élevées que les valeurs théoriques (Tableau IV-4). Il est probable que des effets matrices relatifs aux autres adjuvants des formulations soient à l'origine des surestimations. Dans le cas du Pyrinex, le dosage direct du Chlorpyrifos donne une valeur inférieure à la teneur théorique. De plus, la répétabilité est faible : le coefficient de variation est d'environ de 40 % pour n = 14 injections. Le Pyrinex se présente comme une suspension de capsules. Cette grande variabilité et des valeurs inférieures sont liées à une disponibilité affectée par la forme galénique même : la disponibilité du chlorpyrifos est limitée et aléatoire.

Nom commercial	Matière active	Forme	Composition massique théorique	Composition massique expérimentale moyenne ± ET (n = 3) (%)
Bellis	Boscalid	Granulés beige	25,2 %	38,3 ± 1,4
	Pyraclostrobin		12,8 %	10,7 ± 1,0
Geoxe	Fludioxonil	Poudre blanche	50 %	60,0 ± 5,0
Pyrinex	Chlorpyrifos-Et	Suspension de capsules	22,94 %	13,6 ± 8,0
Teppeki	Flonicamid	Granulés blancs	50 %	Résultats aberrants

Tableau IV-4 : Présentation des formulations commerciales et compositions massiques théoriques et expérimentales des molécules actives

A l'exception du Tepeki, seules les teneurs expérimentales seront prises en compte dans les calculs des taux d'extraction par les supports adsorbants solides pour comparer par la suite leur efficacité.

2. 3. 4. Evaluation des taux de recouvrement des résidus phytosanitaires par extraction liquide-liquide

Les solutions aqueuses de phytosanitaires commerciaux sont diluées dans l'eau saturée en acétate d'éthyle aux concentrations suivantes :

- Bellis à 0,8 g/L ; à 0,2 g/L et à 0,08 g/L ;
- Geoxe à 0,4 g/L ; 0,1 g/L et 0,02 g/L ;
- Pyrinex à 0,5 g/L ; à 0,125 g/L et à 0,02 g/L ;
- Tepeki à 0,075 g/L ; à 0,015 g/L et à 0,0025 g/L.

30 mL de solution aqueuse sont extraits par 10 mL d'acétate d'éthyle saturé en eau pendant 5 minutes sous agitation orbitale à $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ($n = 5$). Les phases sont séparées par centrifugation à 3000 G (10 minutes). La phase organique (+ 40 μL de dodécane) est évaporée à sec sous vide à $+ 40^\circ\text{C}$. L'extrait sec est repris dans 500 μL d'i-octane. 100 μL d'extrait est mélangé avec 50 μL de TDCPP à 597 $\text{ng}/\mu\text{L}$ dans l'i-octane (IS). 1 μL du mélange est injecté directement en CPG/DIF (Cf. § 2. 3. 5.).

Les taux de recouvrement des actifs par extraction liquide-liquide sont représentés sous la forme des histogrammes de la Figure IV-1.

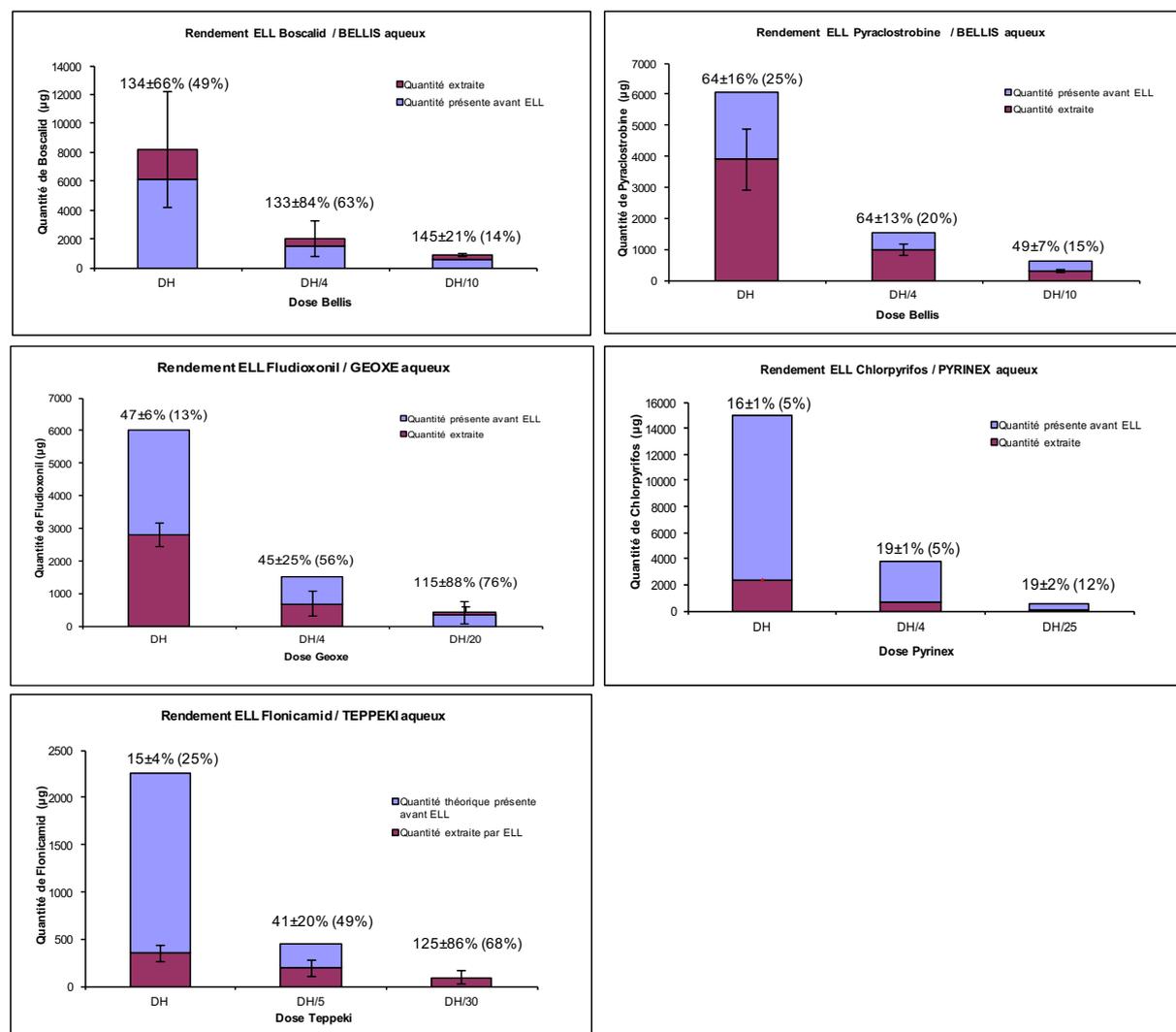


Figure IV-1 : Taux de recouvrement évalués par CPG/DIF des molécules de phytosanitaires formulées commercialement, après extraction liquide-liquide
Légende : DH = dose homologuée

Les taux de recouvrement des extractions liquide-liquide sont généralement liés à la nature et la quantité de molécule active initialement présente en phase aqueuse. Dans le cas du boscalid et du chlorpyrifos, les taux de recouvrement sont du même ordre de grandeur quelle que soit la quantité initiale. Pour la pyraclostrobine et la fludioxonil, ils sont du même ordre de grandeur pour des quantités initiales de matières actives équivalent à la dose homologuée (DH) et la DH diluée quatre fois. Dans le cas du fonicamid, les taux de recouvrement augmentent avec la quantité initiale de matière active à extraire.

2. 3. 5. Les conditions analytiques

Les molécules actives dans les extraits solvant sont dosées par étalonnage interne par CPG/DIF selon les conditions opératoires fixées dans le Tableau IV-5. Des solutions étalons sont diluées entre 4 et 1000 ng/μL dans l'isooctane. 100 μL de chaque étalon (ou du solvant dans le cas d'un blanc) sont mélangés à 50 μL de TDCPP à 597 ng/μL dans l'isooctane (IS).

Module	Varian 3900/HP-5	HP5890/Optima 1701
Colonne	HP-5 30 m x 0,25 mm ID x 0,25 μm df (Agilent)	OPTIMA 1701 15 m x 0,25 mm ID x 0,25 μm df (Macherey Nagel)
Molécule active	Flonicamid Fludioxonil Chlorpyrifos-Et	Flonicamid Boscalid Pyraclostrobine
Quantité injectée (μL)	1	1,5
Solvant	i-octane	i-octane
Température injecteur °C	300	300
Durée splitless (min)	0,75	0,75
Split vent (mL/min)	50	50
Gaz vecteur	He 1,3 mL/min	He 10 psi
Température détecteur °C	300	300
Programmation de la température du four	80°C (2 min)	80°C (0,75 min)
	220°C à 30°C/min	280°C à 20°C/min
	260°C à 5°C/min	280°C (10 min)
	280°C à 20°C/min	

Tableau IV-5 : Paramètres de CPG/DIF

2. 4. Mise en œuvre des supports adsorbants à partir de liquides filmogènes

2. 4. 1. Sélection des supports filmogènes

Les supports filmogènes sélectionnés pour l'étude, listés et codés selon les indications figurant dans le Tableau IV-6, sont tous de grade alimentaire.

Nature	Code
Saccharose	P1
Maltodextrine 12 (Roquettes Frères, Lestrem France)	P2
Maltodextrine 19 (Roquettes Frères, Lestrem France)	P3
Mucilage de lin (Bioplanète, Bram France)	P4
Cellulose	P5
Gomme arabique (Kalys, Bernin France)	S1
Gomme d'acacia (Kalys, Bernin France)	S2
Pectines apple (Fluka)	S3
Pectines citrus (Roquettes Frères, Lestrem France)	S4
Alginate de sodium (Kalys, Bernin France)	S5
Gomme Karaya (Kalys, Bernin France)	S6
HiCap (Roquettes Frères, Lestrem France)	A1
Acide citrique 99% (Sigma)	A2
Sulfate de calcium	A3

Tableau IV-6 : Sélection des supports adsorbants liquides filmogènes

2. 4. 2. Formulations des supports filmogènes

Les supports filmogènes ont été formulés dans l'eau déminéralisée selon les indications figurant dans le Tableau IV-7.

Série	Actif	Concentration (g/100g)	Additif	Concentration (g/100g)
1	P1	70	-	-
	O1	4	-	-
	P2	70	A1	2
	P2	60	O1	7
	P2	60	O3	7
	P3	70	A1	2
	O2	10	-	-
	P4	13	-	-
2	S1	30	S6	14
	S1	30	M4	5
	S2	30	-	-
	S3	6	-	-
	S3	6	A2	0,1
	S3	5	P5	1,4
	S3	2	A3	0,5
	S3	4	A3	0,5
	S3	4	A2	0,1
	S4	6	-	-
S5	2	-	-	

Tableau IV-7 : Formulations des supports filmogènes

L'additif A3 est un gélifiant. Des supports adsorbants P5 et M4 ont également été ajoutés à certaines formulations pour évaluer l'effet combiné de divers supports. Les formulations à base de S3 ont été appliquées uniquement en film. La formulation S1+S6 a été appliquée en film mais également par contact en batch. Toutes les autres formulations ont uniquement été utilisées par contact en batch. Les formulations appliquées au pinceau ont été préparées extemporanément. Toutes les formulations utilisées en batch ont été préparées la veille des essais.

2. 4. 3. Principe des essais

Des lots de pommes de la variété 2 ont été contaminés par immersion dans des solutions aqueuses de produits phytosanitaires commerciaux. Les fruits contaminés sont ensuite décontaminés par application des adsorbants filmogènes au pinceau ou par immersion dans les solutions aqueuses. Les résidus phytosanitaires sont évalués avant et après décontamination. Pour chaque molécule active de phytosanitaire, le taux d'extraction est calculé comme égal à la différence entre le taux résiduel avant et le taux résiduel après application des solutions de décontamination rapportée au taux résiduel initial.

a- Principe de contamination des pommes

Les pommes sont contaminées par lot de 4 à 6 pommes (5 en moyenne) selon le calibre dans 1 L de phytosanitaires en solution aqueuse à la dose homologuée (Tableau IV-8) (Cf. Figure I-16). Les pommes sont agitées manuellement dans la solution pendant 5 minutes puis sèchent à l'air libre sur un égouttoir pendant 24 heures.

Formule commerciale	Phytoprotecteur(s)	Dose homologuée
Bellis	Boscalid et Pyraclostrobine	800 mg / 1 L
Geoxe	Fludioxonil	400 mg / 1 L
Pyrinex	Chlorpyrifos-Et	2 mL / 1 L

Tableau IV-8 : Préparation des solutions aqueuses de phytoprotecteurs pour contamination

b- Principe de décontamination des pommes

Deux méthodes de décontamination ont été testées :

1. par coating (n= 1 pomme par essai)

Les solutions de décontamination des pommes sont appliquées au pinceau 24 heures après la contamination (Figure IV-2). Après séchage de 1 heure à $20 \pm 3^\circ\text{C}$, les films sont éliminés par immersion dans l'eau déminéralisée (1 pomme – 250 ou 500 mL d'eau) sous agitation latérale pendant 15 minutes puis sous courant d'eau déminéralisée à 20°C pour éliminer les éventuels derniers résidus de film polysaccharidique. Les pommes sont pelées et les peaux sont extraites par QuEChERS pour être analysées par CPG/DIF et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse CPG/SM (Cf. paramètres § 2. 4. 6. et § 2. 4. 7.).

N.B. 1 pomme – 250 mL d'eau dans le cas des essais avec Geoxe+Pyrinex ; 1 pomme – 500 mL d'eau dans le cas des essais avec Bellis.

Après application :



Après 1 heure de séchage :



S1+S6

S3

S3+A2

S3+P5

S3+A3

S3+A3+A2

Figure IV-2 : Application des agents filmogènes au pinceau

2. en batch (n = 2 pommes par essai)

Les pommes sont immergées dans les solutions de décontamination (2 pommes 500 / 600 mL) sous agitation orbitale pendant 15 minutes ou 1 heure à $20 \pm 3^\circ\text{C}$. Elles sont ensuite rincées sous un courant d'eau déminéralisée à 20°C et frottées mécaniquement pour éliminer toute la couche polysaccharidique. Les pommes sont pelées et les peaux sont extraites par QuEChERS pour être analysées par CPG/DIF et CPG/SM (Cf. paramètres § 2. 4. 6. et § 2. 4. 7.).

Pour les essais préliminaires de décontamination par filmage, les pommes ne sont pas rincées à l'eau avant l'application du traitement. Pour l'ensemble des autres essais de décontamination en batch, les fruits sont rincés à l'eau à 20°C : 5 pommes dans 1,5 L d'eau déminéralisée en batch de 15 minutes sous agitation latérale puis sous courant d'eau déminéralisée. Les pommes contaminées sont décontaminées 24 heures après la contamination et 15 jours après la décontamination. Dans ce cas, les fruits sont conservés à + 4°C dans un sachet de plastique transparent et fermé (sans être hermétique). Le Tableau IV-9 résume les essais réalisés.

Contamination	Prélavage eau après 24h	Décontamination après 24h	Décontamination après 15 jours
Geoxe et Pyrinex	Non	Application film	Non réalisée
Bellis	Non	Application film	Non réalisée
Bellis	oui	Immersion batch	Immersion batch

Tableau IV-9 : Résumé des essais de décontamination des pomme (Variété 2)

2. 4. 4. Blancs matrice et témoins

Le *blanc matrice* correspond à l'extrait de peaux de référence, avant tout traitement.

Le *témoin de contamination* correspond à l'extrait de peaux de pommes contaminées (Cf. protocole § 2. 4. 3.) et analysées 24 heures après la contamination SANS rinçage à l'eau (cas des coatings).

Le *témoin H2O* correspond à l'extrait de peaux de pommes contaminées et analysées 24 heures après la contamination APRES rinçage par immersion dans un bain d'eau (15 minutes sous agitation latérale) (cas des coatings, équivalent au témoin 24 heures).

Le *témoin 24h* correspond à l'extrait de peaux de pommes contaminées et analysées 24 heures après la contamination APRES rinçage par immersion dans un bain d'eau (15 minutes sous agitation latérale) (équivalent au *témoin H2O* dans le cas des coatings). Il s'agit du point de départ de tous les essais de décontamination en batch.

Le *témoin +10* correspond à l'extrait de peaux de pommes contaminées, rincées à l'eau et conservées en sachet à + 4°C pour être analysées au moins 10 jours après la contamination.

2. 4. 5. Préparation des extraits QuEChERS de peaux de pommes

Les pommes sont pelées et les peaux congelées à l'azote liquide sont broyées au moulin électrique en acier inoxydable. 10 g de purée de peaux sont homogénéisés à l'ultraturax dans 10 mL d'acétonitrile pendant 1 minute à 10000 rpm. Les sels d'extraction (4 g MgSO₄ anhydre + 1 g NaCl + 1 g CTSD + 0,5 g HDS, Q-Sep kit 26235, Restek, France) sont homogénéisés au vortex pendant 1 minute à 3000 rpm. Après centrifugation (10 minutes à 3000 G), l'extrait acétonitrile est intégralement recueilli pour être purifié par SPE dispersive pendant 1 minute au vortex à 3000 rpm (Référence 26221, Restek, France). Après centrifugation (10 minutes à 3000 G), l'extrait purifié est intégralement recueilli pour être évaporé à sec sous vide au Multivapor P-12 (Büchi) à 40°C. Après évaporation, l'extrait sec est resolubilisé dans 500 µL de solvant analytique (i-octane/toluène, 90:10, V/V) sous ultrasons pendant 1 minute. 100 µL de l'extrait sont mélangés à 50 µL de TDCPP à 597 ng/µL dans l'i-octane (IS). 2 µL de l'échantillon sont injectés en CPG-DIF (Cf. paramètres § 2. 4. 6.).

2. 4. 6. Analyse des résidus phytosanitaires par CPG-DIF

Les résidus de boscalid, chlorpyrifos, fludioxonil et pyraclostrobine sont dosés par CPG/DIF au moyen d'un étalonnage interne, selon les paramètres établis dans le Tableau IV-10. 100 µL de chaque étalon (ou du solvant dans le cas d'un blanc) est mélangé à 50 µL de TDCPP à 597 ng/µL dans l'i-octane (IS).

CPG/DIF	Varian 3900	HP5890 Series	Varian 3900
Molécule active	Fludioxonil Chlorpyrifos-ethyl	Boscalid Pyraclostrobine	
Colonne	HP-5 30 m x 0,25 mm ID x 0,25 µm df (Agilent)	OPTIMA 1701 15 m x 0,25 mm ID x 0,25 µm df (Macherey Nagel)	DB-5ms 30 m x 0,25 mm ID x 0,25 µm df (J&W scientific)
Quantité injectée (µL)	1	1,5	2
Solvant	i-octane	i-octane	i-octane/toluène 90 :10
Température injecteur °C	300	300	250
Durée splitless (min)	0,75	0,75	1,20
Split vent (mL/min)	50	50	10
Gaz vecteur	He 1,3 mL/min	He 10 psi	He 1,3 mL/min
Température détecteur °C	300	300	300
Programmation de la température du four	80°C (2 min)	80°C (0,75 min)	80°C (1,20 min)
	220°C à 30°C/min	280°C à 20°C/min	180°C à 25°C/min
	260°C à 5°C/min	280°C (10 min)	280°C à 5°C/min
	280°C à 20°C/min		280°C (20 min)

Tableau IV-10 : Paramètres pour l'analyse quantitative des phytosanitaires par CPG/DIF

2. 4. 7. Analyse des résidus phytosanitaires par CPG-SM

Lorsqu'ils n'ont pas pu être détectés par CPG/DIF, les résidus de boscalid et de pyraclostrobine sont analysés sur un chromatographe Agilent 6890 Series GC System couplé à un spectromètre de masse Agilent 5973 Network Mass Selective Detector. L'appareil est équipé d'une colonne DB-5ms 30 m x 0,25 mm ID x 0,25 µm df (J&W Scientific). Les conditions analytiques de la chromatographie gazeuse sont identiques à celles figurant dans le Tableau IV-10 mais l'injecteur est en mode split (6 mL/min). Les températures de la ligne de transfert, de la source (impact électronique, 70 eV en mode positif) et du quadripôle sont respectivement fixées à 290°C, 230°C et 150°C. L'acquisition en mode scan balaie les masses $m/z = 50-450$. Les fragments majoritaires de chaque molécule sont extraits du courant ionique total (TIC) :

- Boscalid : $m/z = 342$ et $m/z = 140$
- Pyraclostrobine : $m/z = 164$ et $m/z = 132$

Les taux de résidus sont déterminés à partir de l'injection de l'étalon externe correspondant.

Le Tableau IV-11 regroupe les différentes limites de détection (LD) et de quantification (LQ) évaluées pour les molécules de phytosanitaires étudiées en CPG/DIF et en CPG/SM et les compare à celles des laboratoires accrédités.

Méthode	Molécule	Chlor	Flu	Bosc	Thiam	Pyra
CPG/DIF	LD théorique (mg/kg)	60	60	80	75	80
	LQ expérimentale (mg/kg)	250	250	500	250	500
CPG/SM	LD théorique (mg/kg)	0,06	0,06	0,08	0,08	0,08
	LQ expérimentale (mg/kg)	0,25	0,25	0,50	0,25	0,50
CPG/SM ou CLHP/SM (laboratoires accrédités)	LD théorique (mg/kg)	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005
	LQ expérimentale (mg/kg)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01

Tableau IV-11 : Limites de détection et de quantification évaluées pour les différentes méthodes analytiques utilisées dans les travaux

Légende : Chlor = chlorpyrifos, Flu = fludioxonil, Bosc = boscalid, Thiam = thiamethoxam, Pyra = pyraclostrobine

2. 4. 8. Evaluation des niveaux moyens de contamination à éliminer par les traitements filmogènes

Une série d'essais de contamination des pommes de la variété 2 avec du Bellis (boscalid + pyraclostrobine) a eu pour objectif d'évaluer d'une part la répétabilité et la reproductibilité de la contamination 24 heures après et au moins 10 jours après (Annexe 1), et d'autre part les taux moyens de boscalid et de pyraclostrobine à abattre lors des traitements de décontamination.

Les résultats des teneurs résiduelles en boscalid et pyraclostrobine évaluées par CPG/DIF dans le blanc matrice, le témoin H2O et les témoins de contamination après 24 heures et 10 jours sont représentés par les histogrammes de la Figure IV-3.

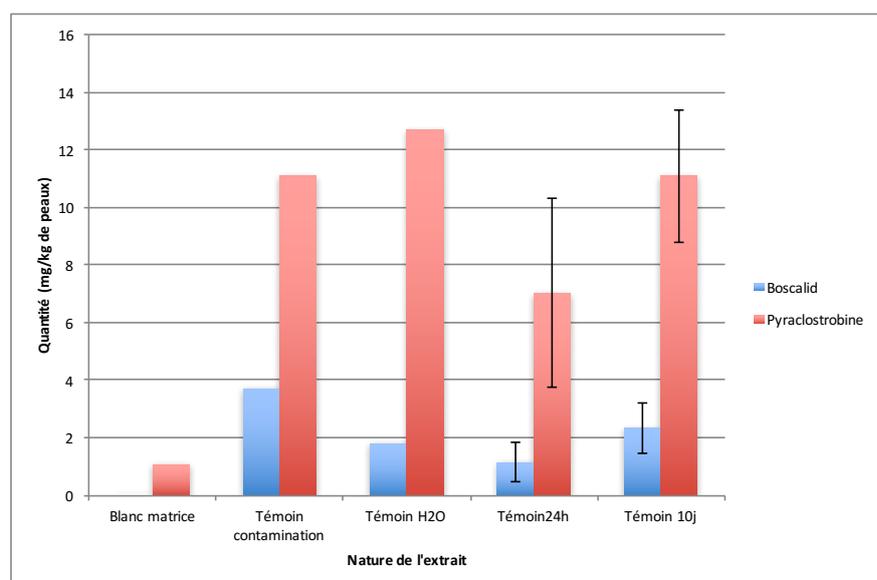


Figure IV-3 : Teneurs en boscalid et en pyraclostrobine des différents témoins après contamination des pommes Fuji par Bellis

L'immersion des pommes dans la solution aqueuse de Bellis a eu pour effet d'augmenter les teneurs résiduelles en phytosanitaires dans la peau des fruits de façon significative par rapport au blanc matrice (= témoin non contaminé).

La variabilité mesurée sur la quantité des deux phytosanitaires ayant pénétré dans les pommes au cours de la contamination est très élevée (Tableau IV-12). Les coefficients de variation sont très élevés sur les mesures effectuées 24 heures après la contamination. Ils sont plus faibles sur les mesures effectuées 10 jours après mais restent supérieures à 20 %, ce qui exprime une répétabilité faible à laquelle peut s'ajouter le caractère inhomogène de la contamination de la matrice lié à l'inhomogénéité de sa structure, comme décrit dans le chapitre II.

Témoin	Phytoprotecteur	Nombre d'échantillons	Coefficient de variation sur la teneur moyenne
24 heures	boscalid	8	58 %
	pyraclostrobine		47 %
10 jours	boscalid	7	37 %
	pyraclostrobine		20 %

Tableau IV-12 : Déviations standards relatives calculées pour les teneurs moyennes en boscalid et pyraclostrobine mesurées dans des pommes (variété 2), 24 heures et 10 jours après contamination par Bellis

Par conséquent, il a été décidé de relever arbitrairement comme références du niveau de contamination les teneurs en boscalid et en pyraclostrobine dont la fréquence de mesure est la plus élevée sur l'ensemble des mesures effectuées (Annexe 1) : **1,5 mg de boscalid et 11 mg de pyraclostrobine par kg d'épidermes**. Ces valeurs seront utilisées par la suite en tant que quantité du résidu initial théorique pour évaluer les taux d'efficacité des supports adsorbants liquides filmogènes à partir de l'équation suivante :

Taux d'extraction

$$= \frac{\text{Quantité résidu après traitement} - \text{quantité résidu initial théorique}}{\text{Quantité résidu initial théorique}} * 100$$

2. 5. Mise en œuvre des agents de vectorisation de nature lipidique

2. 5. 1. Sélection des agents vecteurs

Les agents vecteurs sélectionnés pour l'étude sont de grade alimentaire. Ils ont été sélectionnés parmi les additifs de nature lipidique visant à modifier la cristallisation des corps gras. Ils sont listés et codés dans le Tableau IV-13.

Nature	Code
Tween 80 (Sigma Aldrich) – E433	M1
Sucroesters 5S (Séarinerie Dubois, Ciron France) – E473	5S
Sucroesters 15P (Stéarinerie Dubois, Ciron France) – E473	15P
GMS 50/50 (Stéarinerie Dubois, Ciron France) – E471	GMS
Lécithine de soja (BDH, pord. 298632A) – E322	LS

Tableau IV-13 : Sélection des agents de vectorisation

2. 5. 2. Principe de la modélisation de la décontamination de cires cuticulaires extraites des peaux de pommes de la variété 2

a- Extraction des cires cuticulaires totales des pommes de la variété 2

Environ 50 kg de pommes de la variété 2 sont pelées sur moins de 2 mm d'épaisseur au moyen d'un épluche-pomme mécanique. Les peaux sont soumises à une lyse enzymatique dans une solution tampon citrate 20 mmol/L à pH 4 contient environ 16000 U/L de cellulase et 23600 U/L de pectinase et contenant 10 mmol/L d'azoture de sodium. L'acide citrique anhydre, le citrate de sodium dihydraté ($\geq 99\%$), la cellulase C9748 (*Trichoderma longibrachiatum*, $\geq 1,0$ U/mg), la pectinase (*Aspergillus aculeatus*, solution aqueuse ≥ 3800 U/L) et l'azoture de sodium ($\geq 97,5\%$) sont fournis par Sigma Aldrich. Les peaux sont ensuite congelées à -40° à $-5^\circ\text{C}/\text{min}$ puis lyophilisées sous un vide de 30 Pa dans un lyophilisateur Cryoivoire PILOT 27 1,25 m³ (CryoNext). Les peaux lysées lyophilisées sont finalement broyées pour subir une extraction Soxhlet au chloroforme/méthanol (50 :50, V/V).

L'extrait solvant des cires est ensuite évaporé à sec à 45°C sous vide. Les cires sont réduites en poudre et conservées à l'abri de la lumière à + 4°C.

b- Préparation des échantillons

Les cires sont diluées à 10 g/L dans un mélange chloroforme/méthanol (50:50, V/V). La solution-mère de molécules actives est composée d'un mélange de chlorpyrifos-éthyl, de fludioxonil, de boscalid et de thiamethoxam à 0,4 g/L dans l'acétate d'éthyle ; elle est diluée à différentes concentrations dans la solution de cires. 2 mL sont prélevés au répéteur automatique et déposés dans une boîte de Pétri en verre de 5 cm de diamètre (n = 3). Après évaporation complète du solvant (une nuit), il reste un film de cires contenant entre 250 et 2000 mg de molécules actives et 20 mg de cires.

c- Protocole de décontamination

Les films sont recouverts par 8 g de solution de décontamination. Le temps de réaction est fixé à 3 heures à température ambiante (18 ± 2°C). Le surnageant est ensuite évacué et les films sont rincés dans l'eau déminéralisée jusqu'à élimination complète des solutions. Les films sont séchés à l'air libre à température ambiante pendant 30 minutes avant d'être redissouts dans 2 x 2,5 mL d'un mélange chloroforme/méthanol (50 :50). Les témoins correspondent aux traitements des films de cires + molécules actives par 8 g d'eau déminéralisée.

d- Préparation de l'extrait pour analyse

L'extrait solvant est purifié par SPEd (1500 mg MgSO₄ + 450 mg PSA + 450 mg C18, référence 26221, Reste, France). Le solvant est évaporé à sec sous vide au Multivapor P-12 (Büchi) à + 40°C. L'extrait sec est repris dans 500 µL d'i-octane. 100 µL d'extrait sont mélangés avec 50 µL de TDCPP à 597 ng/µL dans l'i-octane (IS). 1 µL du mélange est injecté directement en CPG/DIF (Cf. § 2. 4. 6.).

Les résultats peuvent être exprimés en taux d'extraction ou en taux résiduels qui tiennent compte des taux de recouvrement après SPEd calculés pour chaque ajout dosé :

Taux d'extraction

$$= \frac{\text{Quantité résidu après traitement} - \text{quantité résidu initial théorique}}{\text{Quantité résidu initial théorique}} * 100$$

$$\text{Taux résiduel} = \frac{\text{Quantité résidu après traitement}}{\text{Quantité résidu initial théorique}} * 100$$

e- Evaluation des taux de recouvrement des résidus phytosanitaires par dSPE

Les taux de recouvrement des résidus phytosanitaires ont été évalués par CPG/DIF après re-solubilisation des films et purification sur SPEd pour les ajouts dosés à 250 ; 500 ; 750 ; 1000 ; 1250 ; 1500 ; 1750 ; 2000 et 2500 mg/kg (n = 4) (Tableau IV-14).

Ajouts dosés (mg/kg cires)	Taux de recouvrement moyen (ET, n = 4)			
	Boscalid	Chlorpyrifos-Et	Fludioxonil	Thiamethoxam
250	139,4 (19,7)	93,8 (10,4)	84,5 (15,0)	94,5 (10,4)
500	100,6 (6,8)	68,3 (1,4)	61,7 (3,9)	72,7 (7,0)
750	49,3 (4,6)	74,3 (2,9)	58,7 (8,3)	67,5 (5,9)
1000	47,9 (2,0)	73,7 (3,6)	57,2 (5,3)	67,6 (8,2)
1250	89,4 (4,7)	62,4 (1,8)	72,8 (4,5)	87,0 (0,7)
1500	41,5 (2,4)	69,5 (5,0)	50,7 (2,0)	59,5 (4,7)
1750	41,0 (0,9)	69,4 (2,3)	45,3 (3,4)	60,5 (3,1)
2000	35,8 (5,7)	66,9 (8,5)	41,0 (4,5)	58,1 (9,1)
2500	80,2 (3,8)	60,8 (2,7)	61,4 (4,0)	76,8 (4,6)

Tableau IV-14 : Taux de recouvrement moyens des molécules de phytosanitaires par extraction solide-liquide

Légende : ET = écart-type

f- Représentation des résultats sous forme de diagramme ternaire

Pour un mélange ternaire phytosanitaire/additif/eau donné, chaque taux d'extraction correspond à une quantité de phytosanitaire solubilisée dans la solution de traitement, *i.e.* qui est passée de la phase solide (cires recristallisées) à la phase liquide (solution de désorption). Le mélange ternaire additif/eau/phytosanitaire extrait est alors étudié. Il correspond à une quantité de phytosanitaires en phase liquide additif/eau dans la solution de désorption. Les points sont représentés dans un diagramme ternaire grâce au logiciel Veusz 1.24.

2. 6. Essais laboratoire de décontamination des pommes pour la mise au point d'un pilote pré-industriel et la proposition d'un procédé visant le zéro résidu détectable

2. 6. 1. Sélection des agents de décontamination

Les agents de décontaminations figurent dans le Tableau IV-15.

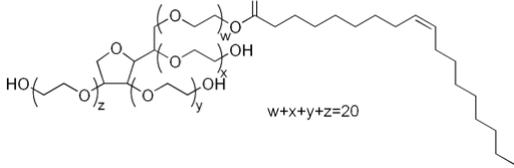
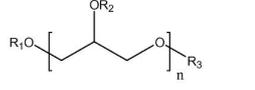
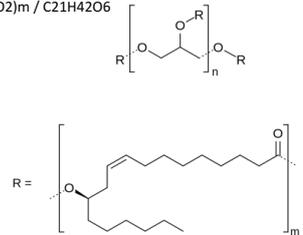
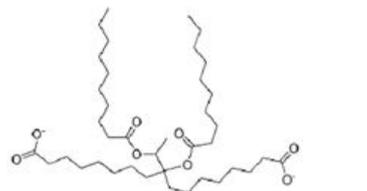
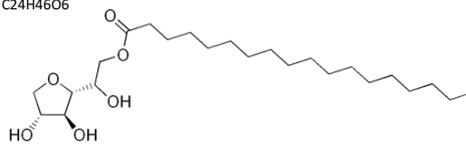
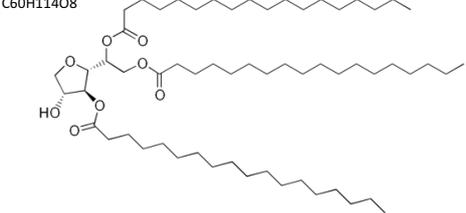
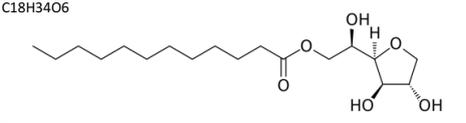
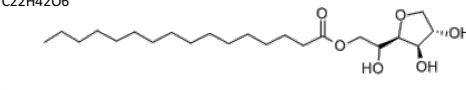
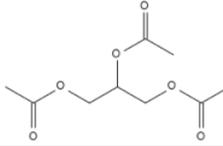
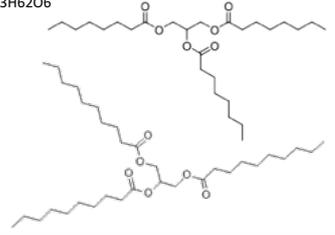
Additif	Nom	CAS	MW (g/mol)	Formules brute et développée	Propriétés- utilisations
E433	Tween 80 = Polyoxyéthylène (20) sorbitan monooleate	9005-65-6	1310	<chem>C64H124O26</chem> 	TA non ionique, modifie la cristallisation des graisses
E475	PGE = Esters de polyglycérols d'acides gras		880	<chem>R1O[CH2]2[CH(OR2)]2[CH2]2OR3</chem> 	Plastifiant dans la synthèse de polymères
E476	PGPR = polyricinoleate de polyglycerol	29894-35-7	2800	<chem>(C3H5O2)n(C18H32O2)m / C21H42O6</chem> 	inhibiteur de cristallisation, réduit la viscosité; plastifiant dans la synthèse de polymères
E477	Diester C8/C10 de propylene glycol	68583-51-7	392,57	<chem>C21H44O6</chem> 	Améliore la fluidité
E491	SMS = monostearate de sorbitan ou SPAN 60	1338-41-6	430,62	<chem>C24H46O6</chem> 	TA non ionique, améliore le mouillage, émulsifiant pour pesticides
E492	STS = tristearate de sorbitan ou SPAN 65	26658-19-5	963,54	<chem>C60H114O8</chem> 	TA non ionique
E493	SML = monolaurate de sorbitan ou SPAN 20	1338-39-2	346,46	<chem>C18H34O6</chem> 	TA non ionique HLB moyen, émulsifiant
E495	SMP = monopalmitate de sorbitan ou SPAN 40	26266-57-9	402,57	<chem>C22H42O6</chem> 	TA non ionique
E1518	Triacetine	102-76-1	218,2	<chem>C9H14O6</chem> 	Solvant, humectant, améliore la résistance au froid et la viscosité de biodiesels, agent plastifiant dans des mélanges de polymères pour le pelliculage des comprimés, antimycosique
MCT	Triglycerides C8/C10 5545 Tricaprilin Tricaprin	73398-61-5 621-76-6	470 554	<chem>C27H50O6 / C33H62O6</chem> 	Solubilisant d'actifs, solvant, additif de lubrification
E414	Gomme arabique				Epaississant

Tableau IV-15 : Liste des additifs alimentaires pour les formulations de décontamination. Légende : TA = tensio-actif

2. 6. 2. Formulations des additifs et procédés de décontamination

Environ 2-3 kg de pommes de chacune des trois variétés en provenance du précalibrage ou du conditionnement sont nettoyés par immersion à température ambiante ($20 \pm 4^\circ\text{C}$) dans 4-6 kg de solution aqueuse formulée selon les proportions figurant dans le Tableau IV-16.

Code	Formulation	Immersion	Rinçage
MCT	pur	15 min	Savon + eau
E414	50 % aqueux	15 min	Eau
Tween 80 ou E433	30 % aqueux	15 min	Eau
E475	20 % E475 + 10 % E433	15 min	Eau
PGPR ou E476	20,6 % E476 + 3,1 % E433	15 min	Savon + eau + liquide dégraissant + eau
E477	20 % E477+ 10 % E433 + 15 % EtOH à 96 %	15 min	Eau
E491 ou SMS	20 % SMS + 10 % E433	15 min	Eau
E492 ou STS	20 % STS + 10 % E433	15 min	Eau
Duo	10 % PGPR + 10 % MCT + 10 % E433	3 heures	Savon + eau
Double Duo	5 % STS + 10 % PGPR + 10 % MCT + 5 % E477 + 15 % E433	3 heures	Savon + eau
Duo+US	10 % PGPR + 10 % MCT + 10 % E433	3 cycles de 10 min US suivis de 10 min repos	Savon + eau
Double Duo+US	5 % STS + 10 % PGPR + 10 % MCT + 5 % E477 + 15 % E433	3 cycles de 10 min US suivis de 10 min repos	Savon + eau
AC	Acétone	3 heures	Savon + eau

Tableau IV-16 : Décontamination des pommes par immersion

Les pommes sont stockées dans des sacs de congélation à $+4^\circ\text{C}$ et envoyées pour analyses des résidus dans les peaux dans deux laboratoires accrédités.

2. 6. 3. Essais de décontamination avec échantillonnage des peaux par moitié

Des essais de nettoyage des pommes ont été effectués sur un échantillon de 3 kg de fruits, soit 10-18 pommes selon les calibres. Avant décontamination, la moitié de la surface des fruits est pelée et sert de référence pour le dosage des résidus avant décontamination. Les pommes sont ensuite nettoyées selon la procédure suivante : application du traitement en batch avec action mécanique pendant 15 minutes à $15 \pm 4^\circ\text{C}$ et rinçage (Tableau IV-17). L'autre moitié de la surface des fruits est pelée pour analyse des résidus après décontamination.

Code	Formulation	Immersion	Rinçage
MCT	Cf. Tableau IV-16		
E475			
PGPR ou E476			
E477			
E491 ou SMS			
E492 ou STS			
E493 ou SML	20 % SML + 10 % Tween 40	15 min	Eau
E495 ou SMP	20 % SMP + 10 % E433	15 min	Eau
AC	Acétone	15 min	Eau

Tableau IV-17 : Décontaminations des pommes par moitié par application avec action mécanique

Les peaux congelées sont broyées et les extraits QuEChERS réalisés et analysés selon la procédure figurant au paragraphe 2. 4. 5.

2. 7. Evaluation des paramètres de solubilité de Hansen

2. 7. 1. Paramètres expérimentaux

Les paramètres de solubilité de Hansen (HSP) ont été évalués pour les cires totales extraites des peaux de pommes de la variété 2, l'acide oléanolique ($\geq 97\%$, Sigma Aldrich), le chlorpyrifos-ethyl (99,9 %, Sigma Aldrich), le thiamethoxam (99,7 %, Sigma Aldrich), la lécithine de soja à 10 % dans l'eau, le Tween 80 (Sigma Aldrich), le MCT C8/C10 et le E477 (Stéarinerie Dubois), les additifs alimentaires E475, E476, E491, E492, E493, E495, E414 et E1518 (Kalys). Cinquante solvants dont les paramètres de solubilité sont connus ont été sélectionnés.

Dans un tube Eppendorf, 10 mg de solide (cires, matières actives) sont dissous dans 1 mL de solvant ou 250 μ L d'additif liquide sont dilués dans 250 μ L de solvant (ou 250 mg si très visqueux dans 250 mg de solvant) ou 150 mg d'additif solide sont dissous dans 500 μ L de solvant. Les tubes Eppendorf sont placés dans un bain à ultrasons pendant une minute. Après 15 minutes de repos à température ambiante ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), la turbidité des solutions est évaluée. La solubilité est scorée de 0 à 5, 0 représentant un mélange non soluble, 1 la solubilité totale (solubilité décroissante de 1 à 5). Les scores ont été établis pour être saisis sur le logiciel HSPiP v4.1.07 qui calcule pour chaque substance les paramètres de solubilité δ_d , δ_p et δ_h ainsi que le rayon de la sphère de solubilité R_0 et dessine la sphère.

2. 7. 2. Paramètres théoriques

Les HSP peuvent également être calculés à partir des codes Smiles ou InChI des molécules. Le logiciel calcule les HSP selon la théorie des groupes (Hansen 2000 [1]).

2. 7. 3. Evaluation de l'affinité de deux molécules

Le *Relative Energy Difference* RED représentant l'affinité d'une molécule vis-à-vis d'une autre située au centre de la sphère est calculé à partir du rapport R_a/R_0 où R_a est la distance entre les deux molécules (Cf. § I- 3. 2. 5., équation 4). Plus le RED tend vers 0, plus la distance entre les deux molécules est courte. Si le RED est supérieur à 1, la molécule se situe en dehors de la sphère de solubilité de la seconde molécule. Elles n'auront aucune affinité.

2. 7. 4. Calcul des volumes molaires des solvants

Le volume molaire V_m d'une molécule correspond au volume en mL qu'occupe une mole de solvant. V_m (mL/mol) d'un solvant est égal au rapport entre la masse molaire (g/mol) du solvant et sa densité (g/mL). Les V_m peuvent être estimés pour toutes les molécules grâce au logiciel HSPiP v4.1.07.

2. 8. Caractérisation des milieux et évaluation de l'efficacité des plastifiants par RMN ^{13}C et ^{19}F en milieu solide

2. 8. 1. Préparation des échantillons

a- Préparation des cuticules entières

Les cuticules de pommes de la variété 2 sont isolées par voie enzymatique selon la procédure développée dans le paragraphe 2. 5. 2. Les cuticules isolées sont conservées humides à -24°C .

b- Préparation des cuticules décirées et des cires

1 g de cuticules entières est décirée dans 25 mL du mélange solvant chloroforme/méthanol (50 :50, V/V) pendant 24 heures sous agitation. Le mélange est filtré sur membrane GH Polypro 0,45 μm sous vide. Le résidu correspond aux cuticules décirées. Les cires sont récupérées après évaporation à sec sous courant d'azote du mélange solvant.

c- Sorption du fludioxonil dans les cuticules entières, les cuticules décirées et les cires

5 g de matrice sont homogénéisés dans 50 mL de Geoxe à 0,28 g/L dans l'eau déminéralisée pendant 48 heures. Les matrices contiennent l'équivalent de 0,14 % massique de fludioxonil. Le mélange est filtré sur papier sous vide et rincé avec un minimum d'eau déminéralisée pour éliminer le Geoxe éventuellement non sorbé. Les échantillons sont séchés à l'air libre et conservés à -24°C .

d- Désorption du fludioxonil par les plastifiants

Quatorze additifs alimentaires de nature lipidique ont été sélectionnés pour leurs propriétés de fluidification vis-à-vis des structures lipidiques. La gomme arabique figure également dans la sélection suite aux évaluations des supports adsorbants (Cf. § 2. 4.). Ils sont évalués ici en tant que plastifiants de la cuticule, intervenant dans la mobilité des molécules de phytosanitaires. Ils sont présentés dans le Tableau IV-15. Les additifs MCT, E476 et E477 ont été fournis par la Stéarinerie Dubois (Ciron, France). Les autres additifs ont été achetés auprès de Kalys (Bernin France).

Environ 1 g de matrice à 0,14 % massique de fludioxonil est homogénéisé pendant 15 minutes ou 24 heures dans l'agent. Les agents liquides sont utilisés purs, les solides sont formulés à 20 % dans l'eau additionnée de 10 % de Tween 80 (E433). Les mélanges sont filtrés sur papier sous vide. Environ 500 mg sont réservés, séchés sur papier absorbant et conservés dans des tubes Eppendorf à -24°C jusqu'à analyses. Les 500 mg restants sont rincés selon la procédure suivante afin d'éliminer les résidus d'agent : 25 mL d'eau sous vide suivi par 25 mL homogénéisés pendant 1 minute avant d'être filtrée sous vide suivi par 25 mL d'éthanol à 96% homogénéisés pendant 1 minute avant d'être filtré sous vide suivi par 25 mL d'éthanol à 96% sous vide. Les échantillons lavés sont séchés à l'air libre sur papier absorbant et conservés dans des tubes Eppendorf à -24°C jusqu'à analyse.

La référence correspond à l'échantillon matrice + 0,14 % de fludioxonil sorbé. Le témoin correspond à l'échantillon matrice + 0,14 % de fludioxonil sorbé ayant subi la procédure de rinçage à l'eau et à l'éthanol.

2. 8. 2. Localisation de la molécule de fludioxonil dans la cuticule par RMN du ^{13}C en milieu solide

Les spectres de RMN du ^{13}C à l'état solide ont été acquis sur un BRUKER Avance III 400 (9,4 T). Les échantillons ont été placés dans des rotors en zircone de 4 mm. La vitesse de rotation autour de l'angle magique (MAS) a été réglée à 10 kHz. Les spectres ^{13}C ont été enregistrés selon trois techniques :

- par polarisation croisée en utilisant le couplage dipolaire $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (Cross Polarization Magic Angle Spinning ou CP-MAS),
- par polarisation directe pour observer l'ensemble des résonances ^{13}C (Direct Polarization Magic Angle Spinning ou DP-MAS),
- et par transfert de polarisation en utilisant le couplage scalaire $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer Magic Angle Spinning ou INEPT-MAS).

Les spectres ^{13}C ont été enregistrés avec un temps de recyclage de 2 secondes pour les expériences CP et INEPT et 10 secondes pour l'expérience DP. Pour l'expérience CP, le temps de contact a été fixé à 2 millisecondes. Pour l'expérience INEPT, les délais inter-impulsions ont été synchronisés avec la vitesse de rotation et optimisés pour un couplage scalaire J_{CH} de 140 Hz. Les temps d'acquisition moyens des expériences CP, INEPT et DP ont été de 1h, 1h20 et 3h30 pour des masses d'échantillon de 60-70 mg.

2. 8. 3. Evaluation de l'efficacité des plastifiants sur l'élimination du fludioxonil dans la cuticule et données dynamiques sur le fludioxonil par RMN du ^{19}F en milieu solide

Les spectres de RMN du ^{19}F à l'état solide ont été acquis au moyen d'un spectroscope BRUKER Avance III 400 (9,4 T). Les échantillons ont été placés dans des rotors en zircone de 4 mm. Les vitesses de rotation autour de l'angle magique (MAS) ont été réglées entre 8 et 11 kHz. Les spectres ont été acquis avec la séquence d'impulsion EASY (Jaeger et Hemmann 2014 [2]) qui permet l'élimination des signaux ^{19}F extérieurs à l'échantillon (signaux parasites de la tête de mesure).

2. 9. Essais de faisabilité d'un procédé de décontamination sur pilote laboratoire MAF Roda

2. 9. 1. Principe des essais

Des lots de pommes Fuji (variété 2) sont contaminés par immersion dans des solutions aqueuses de produits phytosanitaires commerciaux. Les fruits contaminés sont ensuite décontaminés par application des différentes formulations au moyen du pilote laboratoire mis au point par MAF Roda (Figure IV-4). Les résidus phytosanitaires sont évalués avant et après décontamination. Pour chaque molécule active de phytosanitaire, le taux d'extraction est calculé comme égal à la différence entre le taux résiduel avant et le taux résiduel après application des solutions de décontamination rapporté au taux résiduel initial.

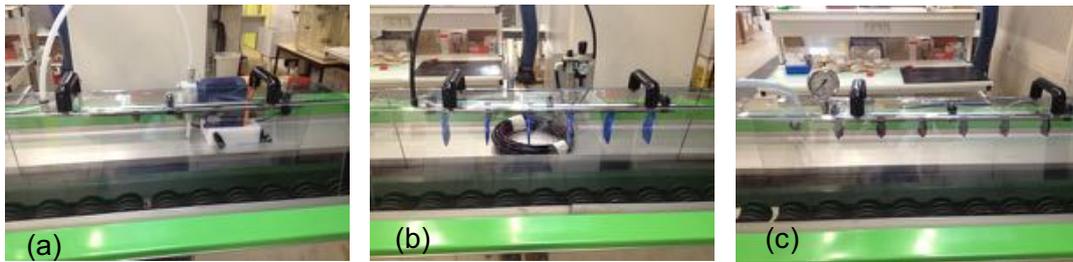


Figure IV-4 : Pilote laboratoire MAF Roda

Légende : (a) zone de vaporisation des formulations de décontamination,
(b) zone de séchage des films (air comprimé),
(c) zone de rinçage (eau de ville avec chauffe-eau)

2. 9. 2. Contamination des pommes et échantillonnage

Deux lots A et B de 24 pommes chacun sont contaminés l'un après l'autre par immersion dans une solution de phytosanitaires commerciaux (Tableau IV-18) pendant 5 minutes sous agitation.

Formule commerciale	Pesticide(s)	Dose homologuée	Quantité / 5 L eau de ville
Bellis	Boscalid et Pyraclostrobine	800 mg / 1 L	4 g
Geoxe	Fludioxonil	400 mg / 1 L	2 g
Pyrinex	Chlorpyrifos-Et	2 mL / 1 L	10 mL
Actara	Thiamethoxam	300 mg / 1L	1,5 g

Tableau IV-18 : Préparation de la solution aqueuse de phytosanitaires pour contamination

Elles sont rincées par lot de 12 pommes par immersion dans un seau d'eau de ville pendant 15 minutes sous agitation latérale. Elles sont égouttées sur du papier adsorbant et échantillonnées pour les références et les essais de décontamination. Chaque échantillon est composé de 3 pommes provenant de chaque lot A et B, de manière à limiter les variabilités intrinsèques de contamination. Deux séries d'échantillons sont préparées :

- l'une correspondant aux essais de décontamination intervenant dans un délai de 24 heures après contamination,
- l'autre correspondant aux essais de décontamination intervenant dans un délai de 8 jours après contamination.

Pour chaque série, quatre échantillons sont préparés : une référence H₂O et un essai par solution de décontamination. Les échantillons référence H₂O correspondent aux pommes décontaminées selon le procédé présenté ci-après dans lequel l'eau remplace les solutions de décontamination dans la zone de vaporisation (a) du pilote (Figure IV-4).

Les échantillons sont stockés dans des sachets de congélation zippés à + 4°C jusqu'à la phase de décontamination.

2. 9. 3. Déroulement des essais de décontamination sur le pilote laboratoire

La zone de vaporisation (a) du pilote laboratoire (Figure IV-4) est équipée d'une buse inox (LF 0,4-40). La puissance de la pompe est fixée à 80 %, pour un ratio 1 :1. Le débit est réglé manuellement entre 40 et 70 % pour obtenir un jet fin et uniforme en fonction des formulations. La vitesse du convoyeur est variable. La vitesse de rotation des bicônes est plus rapide de manière à permettre une rotation rapide des fruits pour un meilleur enrobage. La pression de l'air comprimé pour la phase de séchage (b) des films est fixée à 40 kPa de manière à ne pas repousser le film encore humide à la surface des fruits. La température de l'eau de rinçage (c) est fixée à 21°C.

Le temps de passage dans chaque zone de traitement est identique et correspond à 3 passages. Au total, la durée de traitement n'excède pas 5 minutes.

2. 9. 4. Formulations pour essais

Deux séries d'essais sont réalisées comme indiqué dans le Tableau IV-19.

Série 1 : décontamination 24h après contamination		
Identification	Solution de décontamination	Nb de pommes
Référence H2O-24h	Eau	6
Taq	Tween 80 à 12,5 % aqueux, pH = 7,42	6
Taqac	Tween 80 à 12,5 % aqueux, acidifié par acide acétique glacial : pH = 4	6
Tal	Tween 80 à 12,5% dans EtOH 96 %	6
Série 2 : décontamination 8 jours après contamination		
Identification	Solution de décontamination	Nb de pommes
Référence H2O-8j		4
PC	Pectines Citrus à 6 % aqueux ¹	6
T12%-4	Tween 80 à 12,5 % aqueux ²	2
T33%-4	Tween 80 à 33 % dans H ₂ O/EtOH (50 : 50, V/V) ²	2
T33%-15	Tween 80 à 33 % dans H ₂ O/EtOH (50 : 50, V/V) ³	2
T-PC	Tween 80 à 12,5 % + pectines Citrus à 6% dans H ₂ O/EtOH (50 : 50, V/V) ³	2
X	Cire Xedasol ⁴	3

Tableau IV-19 : Formulations pour essais de décontamination des pommes sur pilote laboratoire (Variété 2)

Légende : ¹filmage par immersion dans la solution de pectines, trop épaisse pour être vaporisée. La phase de séchage sous air comprimé est rallongée à 20 minutes. Le rinçage dure 15 minutes sous une eau à 34°C puis les pommes trempent dans une eau à 21°C pendant 15 minutes,
²décontamination par immersion de 4 minutes. Phase de rinçage sous une eau à 34°C puis trempage dans une eau à 21°C pendant 5 minutes,
³décontamination par immersion de 15 minutes. Phase de rinçage sous une eau à 34°C puis trempage dans eau à 21°C pendant 5 minutes,
⁴après vaporisation de la cire, les films sèchent à l'air libre pendant 24 heures. Ils sont redissous dans de l'éthanol à 96 %. La solution éthanolique est concentrée à moins de 5 mL puis le volume est rajusté à 10 mL avant injection en CPG/SM

2. 9. 5. Préparation des extraits pour analyse par CPG/SM

10 g de peaux broyées (n = 2) sont mélangées à 1 mL d'eau déminéralisée, 300 µL de TDCPP à 0,5 g/L dans l'acétate d'éthyle et 10 mL d'acétonitrile. Le protocole d'extraction est celui figurant au paragraphe 2. 4. 5. Les extraits secs sont repris dans 10 mL d'acétate d'éthyle. 2 µL sont injectés en mode splitless du chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse Agilent (Cf. paramètres § 2. 4. 7.). Les résidus sont quantifiés par étalonnage interne. Les étalons de boscalid, chlorpyrifos-ethyl, fludioxonil et thiamethoxam sont dilués entre 0,01 et 5 mg/L dans l'acétate d'éthyle et la concentration du TDCPP est égale à 1,5 mg/L. L'acquisition des spectres est programmée en mode *Single Ion monitoring* SIM (Tableau IV-20).

Molécule	Ion majoritaire pour quantification	Ratio d'ions pour vérification
Boscalid	342	342 / 140
Chlorpyrifos-ethyl	314	314 / 197
Fludioxonil	248	182 / 248
Thiamethoxam	182	212 / 182
TDCPP	381	321 / 381

Tableau IV-20 : Paramètres de quantification des phytosanitaires par CPG/SM en mode SIM

2. 10. Mise en œuvre des essais sur pilote préindustriel MAF Roda en station fruitière

2. 10. 1. Sélection des pommes et des traitements

Les pommes de la variété 2 ont été sélectionnées en sortie de précalibrage pour la mise au point d'un procédé visant le zéro résidu détectable. Les résidus phytosanitaires sélectionnés pour le suivi analytique sont ceux figurant dans le Tableau IV-1.

Le MCT, la triacétine E1518, le Tween 80 E433, l'acétone, l'acétate d'éthyle et l'éthanol ont été retenus pour cette étape de transfert pilote laboratoire-industriel.

2. 10. 2. Pilote préindustriel MAF Roda

Le pilote préindustriel a été conçu et réalisé par MAF Roda, partenaire du projet FUI INNO'POM, sur la base d'un cahier des charges issu de nos premiers travaux (Figure IV-5). Il a été installé sur la station fruitière de Quercy Soleil, à Moissac dans le Tarn & Garonne, appartenant au groupe BLUE WHALE.

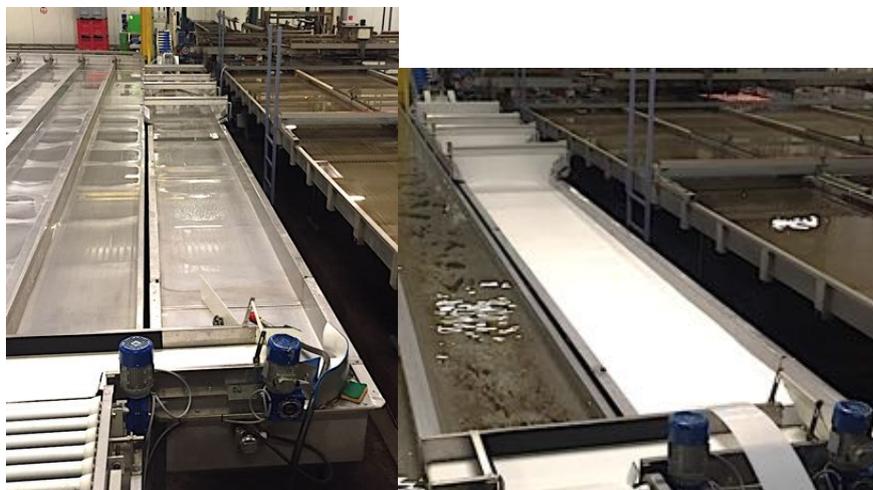


Figure IV-5 : Pilote préindustriel en station fruitière

2. 10. 3. Réalisation des essais

Quatre campagnes d'essais ont été réalisées :

- La première correspond aux essais codés de A1 à B2,
- La seconde aux essais codés de MAE2 à TEACeT15,
- La troisième aux essais codés de Témoin AC5 à ForD,
- La dernière aux essais codés de M5E2A5 à E5M5A5.

Les essais pilote codés de A1 à B2 ont été réalisés sur 100 pommes. Tous les autres essais ont été réalisés sur 10 pommes (soit environ 1,5 kg) (Tableau IV-21). Les zones surlignées en gris correspondent à des ruptures de process par rapport au pilote industriel conçu initialement. Toutes les étapes de rinçage et de vaporisation sont effectuées au moyen des buses et des pompes.

Code	N° étape process					
	1	2	3	4	5	6
A1	Immersion 60 min / MCT 10,5 % aq	-	Vaporisation MCT pur	Rinçage savon	-	-
A2	Immersion 60 min / MCT 11,5 % aq	-	Vaporisation MCT pur (temps contact = 15 min)	Rinçage savon	-	-
A3	Immersion 60 min / MCT 12,5 % aq	-	Vaporisation MCT pur (temps contact = 15 min)	Rinçage EtOH 96 %	-	-
A'2	Immersion 17 heures / MCT 13,4 % aq	-	Vaporisation MCT pur (temps contact = 15 min)	Rinçage savon	-	-
A'3	Immersion 17 heures / MCT 13,4 % aq	-	Vaporisation MCT pur (temps contact = 15 min)	Rinçage EtOH 96 %	-	-
B1	Immersion 2,5 min / MCT 13,4 % aq	Rinçage EtOH 96 %	-	-	-	Rinçage savon
B2	Immersion 60 min / MCT 13,4 % aq	Rinçage EtOH 96 %	-	-	-	Rinçage savon
MAE2	Immersion 15 min / MCT pur	-	Immersion > 2,5 min (avec douches) / MCT 14 % aq	-	Immersion 2 min / acétate éthyle	Rinçage savon
MAC2	Immersion 15 min / MCT pur	-	Immersion > 2,5 min (avec douches) / MCT 14 % aq	-	Immersion 2 min / acétone	Rinçage savon
MAE5	Immersion 15 min / MCT pur	-	Immersion 2,5 min (sans douches) / MCT 14 % aq	-	Immersion 5 min / acétate éthyle	Rinçage savon
MAC5	Immersion 15 min / MCT pur	-	Immersion 2,5 min (sans douches) / MCT 14 % aq	-	Immersion 2 min / acétone	Rinçage savon
TEt2	Immersion 2 min / E1518 pur	-	Immersion 2 min / E1518 30 % aq	-	Immersion 2 min / EtOH 96 %	Rinçage savon
TEt15	Immersion 15 min / E1518 pur	-	Immersion 15 min / E1518 30 % aq	-	Immersion 15 min / EtOH 96 %	Rinçage savon
TEt60	Immersion 60 min / E1518 pur	-	Immersion 60 min / E1518 30 % aq	-	Immersion 5 min / EtOH 96 %	Rinçage savon
TEt24	Immersion 76 min / E1518 pur	-	Immersion 14 heures / E1518 30 % aq	-	Immersion 2 min / EtOH 96 %	Rinçage savon
T5AC2	Immersion 5 min / E1518 pur	-	Immersion 2 min / E1518 30 % aq	-	Immersion 2 min / acétone	Rinçage savon
TAE1	Immersion 1 min / E1518 pur	-	Immersion 2 min / E1518 30 % aq	-	Immersion 1 min / acétate éthyle	Rinçage savon
TAET2	Immersion 2 min / E1518 pur	-	Immersion 2 min / E1518 30 % aq	-	Immersion 2 min / (50 % E1518 + 50 % acétate éthyle)	Rinçage savon
TACT2	Immersion 15 min / E1518 pur	-	Immersion 2 min / E1518 30 % aq	-	Immersion 2 min / (50 % E1518 + 50 % acétone)	Rinçage savon
TAEt5	Immersion 2 min / (50 % E1518 + 50 % acétate éthyle)	-	Immersion 2 min / E1518 30 % aq	-	Immersion 5 min / EtOH 96 %	Rinçage savon
TAE20''Et5	Immersion 20 sec / (50 % E1518 + 50 % acétate éthyle)	-	Immersion 2 min / E1518 30 % aq	-	Immersion 5 min / EtOH 96 %	Rinçage savon

Tableau IV-21 : Essais pour la mise au point du procédé industriel de décontamination des pommes en station fruitière (1/2)

Code	N° étape process					
	1	2	3	4	5	6
TACet2	Immersion 5 min / (50 % E1518 + 50 % acétone)	-	Immersion 2 min / E1518 30 % aq	-	Immersion 2 min / EtOH 96 %	Rinçage savon
TACet15	Immersion 20 sec / (50 % E1518 + 50 % acétone)	-	Immersion 2 min / E1518 30 % aq	-	Immersion 15 min / EtOH 96 %	Rinçage savon
AC5	Immersion 5 min / acétone	Rinçage savon	-	-	-	-
AE5	Immersion 5 min / acétate d'éthyle	Rinçage savon	-	-	-	-
Et5	Immersion 5 min / EtOH 96%	Rinçage savon	-	-	-	-
Et15	Immersion 15 min / EtOH 96%	Rinçage savon	-	-	-	-
TAC2	Immersion 15 min / E1518 pur	-	Immersion > 2,5 min (avec douches) / E1518 30 % aq	-	Immersion 2 min / acétone	Rinçage savon
TAC5	Immersion 15 min / E1518 pur	-	Immersion 2,5 min (sans douches) / E1518 30 % aq	-	Immersion 5 min / acétone	Rinçage savon
A5T2	Immersion 5 min / acétone	Rinçage eau	Immersion 2,5 min / E1518 30 % aq	-	-	Rinçage savon
A5T60	Immersion 5 min / acétone	Rinçage eau	Immersion 60 min / E1518 30 % aq	-	-	Rinçage savon
A5T2Et15	Immersion 5 min / acétone	Rinçage eau	Immersion 2,5 min / E1518 30 % aq	-	Immersion 15 min / EtOH 96 %	Rinçage savon
A2T15Et5	Immersion 2 min / acétone	Rinçage eau	Immersion 15 min / E1518 pur	-	Immersion 5 min / EtOH 96 %	Rinçage savon
A5T15Et2	Immersion 5 min / acétone	Rinçage eau	Immersion 15 min / E1518 pur	-	Immersion 2 min / EtOH 96 %	Rinçage savon
ForA	Immersion 5 min / (40 % E1518 + 50 % MCT + 10 % E433)	Rinçage savon	-	-	-	-
ForB	Immersion 5 min / (60% MCT + 30 % E433 + 10 % EtOH)	Rinçage savon	-	-	-	-
ForC	Immersion 5 min / (48 % H2O + 20 % EtOH + 24 % E1518 + 8 % E433)	Rinçage savon	-	-	-	-
ForD	Immersion 5 min / (50 % Acétone + 50 % MCT)	Rinçage savon	-	-	-	-
M5T2A5	Immersion 5 min / MCT pur	Rinçage E433 17 % EtOH	Immersion 2 min / E1518 30 % aq	Rinçage eau	Immersion 5 min / acétone	Rinçage savon
T2M5A5	Immersion 2 min / E1518 30%aq	Rinçage eau	Immersion 5 min / MCT pur	Rinçage E433 17%EtOH	Immersion 5 min / acétone	Rinçage savon
A5M5T2	Immersion 5 min / acétone	Rinçage eau	Immersion 5 min / MCT pur	Rinçage E433 17%EtOH	Immersion 2 min / E1518 30 % aq	Rinçage savon
A5T2M5	Immersion 5 min / acétone	Rinçage eau	Immersion 2 min / E1518 30 % aq	Rinçage eau	Immersion 5 min / MCT pur	Rinçage E433 17 % EtOH
T5M2A5	Immersion 5 min / E1518 pur	Rinçage E433 17 % EtOH	Immersion 2 min / MCT 30 % aq	Rinçage eau	Immersion 5 min / acétone	Rinçage savon
M2T5A5	Immersion 2 min / MCT 30 % aq	Rinçage eau	Immersion 5 min / E1518 pur	Rinçage E433 17%EtOH	Immersion 5 min / acétone	Rinçage savon
A5T5M2	Immersion 5 min / acétone	Rinçage eau	Immersion 5 min / E1518 pur	Rinçage E433 17%EtOH	Immersion 2 min / MCT 30 % aq	Rinçage savon
A5M2T5	Immersion 5 min / acétone	Rinçage eau	Immersion 2 min / MCT 30 % aq	Rinçage eau	Immersion 5 min / E1518 pur	Rinçage E433 17 % EtOH
M5T5A5	Immersion 5 min / MCT pur	Rinçage E433 17 % EtOH	Immersion 5 min / E1518 pur	Rinçage E433 17%EtOH	Immersion 5 min / acétone	Rinçage savon
T5M5A5	Immersion 5 min / E1518 pur	Rinçage E433 17 % EtOH	Immersion 5 min / MCT pur	Rinçage E433 17%EtOH	Immersion 5 min / acétone	Rinçage savon

Tableau IV-21 : Essais pour la mise au point du procédé industriel de décontamination des pommes en station fruitière (2/2)

Les pommes par échantillon de 10 sont conservées dans des sachets zippés à + 4°C puis envoyées pour analyse des résidus phytosanitaires dans le fruit entier dans un laboratoire de contrôle accrédité.

3. Résultats et discussion

L'objectif de ces travaux est de proposer un procédé d'extraction des molécules phytosanitaires encore présentes, à des teneurs très faibles dans l'épiderme des pommes en sortie de précalibrage (< 1 mg/kg d'épiderme, soit < 0,1 mg/kg de fruits frais). Ce procédé inclut un équipement industriel en station fruitière et une ou plusieurs solutions chimiques de désorption des molécules. Les résultats obtenus ont conduit à identifier les paramètres majeurs afin de lever les verrous technologiques liés aux différents modules de la chaîne de décontamination.

Plusieurs étapes préalables ont été nécessaires : (i) identification des produits d'extraction, (ii) étude des interactions entre une molécule de phytosanitaire témoin et les molécules d'extraction dans la membrane cuticulaire et (iii) validation des formules sur pommes en laboratoire, pour établir quels paramètres rentrent en jeu et quelles caractéristiques physico-chimiques doivent présenter les solutions de désorption en vue d'une extraction optimale.

Cette partie de résultats et discussion développe chacune de ces étapes jusqu'aux résultats de décontamination obtenus sur pilote préindustriel :

- évaluation des molécules d'extraction (supports adsorbants solides, liquides filmogènes et systèmes organisés lipidiques - plastifiants),
- mise au point d'une formulation d'extraction des molécules de phytosanitaires sur pommes,
- étude de la dynamique d'une molécule de phytosanitaire témoin (fludioxonil) dans la cuticule de pommes (variété Fuji) en présence de plastifiants,
- mise en œuvre d'une étape intermédiaire d'expérimentation sur pilote laboratoire pour appréhender les verrous technologiques liés aux différents modules utilisés en station fruitière,
- mise en œuvre des essais industriels sur pilote en station fruitière.

3. 1. Evaluation des supports adsorbants solides

Deux grandes catégories d'adsorbants ont été étudiées, les adsorbants minéraux et les adsorbants organiques (Cf. Tableau IV-2 § 2. 3. 1.). Les résines (M1 et M2), les charbons actifs (M3 et M4) et les argiles (M5) sont réputés très adsorbants. Le charbon actif est très efficace sur la Carbendazime, par exemple, avec un taux d'adsorption de 429 mg/g lorsqu'il est utilisé pur et 110 mg/g lorsqu'il est formulé (Giry *et al.* 2001 [3]). Les alumines et les oxydes minéraux, les argiles (bentonite, montmorillonite) ainsi que les résines (Kyriakopoulos *et al.* 2005 [4]) sont aussi utilisés. L'adsorption des résidus phytosanitaires par les terres de diatomées est décrite par l'isotherme de Freundlich. Cet isotherme est lié aux propriétés physico-chimiques des composés telles que le $\log K_{O/E}$, les solubilités... Agdi *et al.* 2000 [5] ont éliminé ainsi 4 pesticides chlorés dont le Chlorpyrifos jusqu'à 75 % éliminés en batch. Parmi les composés organiques, les sucres (O1 et O2) et les protéines comme O3 et O4 sont de très bons adsorbants. Les polysaccharides proposent une large gamme de molécules (Cunha *et al.* 2010 [6]) parmi lesquelles le chitosan (O2) a été étudié pour ses propriétés

adsorbantes en complexe avec les cyclodextrines (Karim et Adnan 2012 [7]) et avec l'argent (Yoshizuka *et al.* 2000 [8]) sur le chlorpyrifos et le méthyl parathion.

Leur efficacité a été évaluée vis-à-vis de quatre formulations commerciales de phytosanitaires en solutions aqueuses selon le protocole décrit dans le paragraphe 2. 3. Dans un premier temps, les résultats exprimant les rendements d'extraction des molécules d'actifs concernées (chlorpyrifos-éthyl / Pyrinex, fludioxonil / Geoxe, Flonicamid / Tepeki et boscalid + Pyraclostrobine / Bellis) sont présentés. Notons que seules les teneurs expérimentales en molécules actives dans les formules commerciales ainsi que leur taux de recouvrement par extraction liquide/liquide ont été prises en compte dans les calculs des taux d'extraction par les supports adsorbants afin de comparer leur efficacité. Dans un second temps, un bilan global des efficacités comparées est dressé et les interactions phytosanitaires/supports sont discutées.

3. 1. 1. Rendements d'extraction du chlorpyrifos-Et/Pyrinex par les supports adsorbants

Les histogrammes de la Figure IV-6 représentent les taux d'extraction du chlorpyrifos par les supports adsorbants solides pour une concentration initiale de 500 ng/μL dans l'eau. Deux séries d'essais ont été mises en œuvre pour lesquelles les masses d'adsorbant diffèrent d'un facteur 10 entre la série N°1 et la série N°2 (Cf. Tableau IV-3, § 2. 3. 2). Les résines M1 et M2 ont été testées seulement pour des ratios élevés (série N°1).

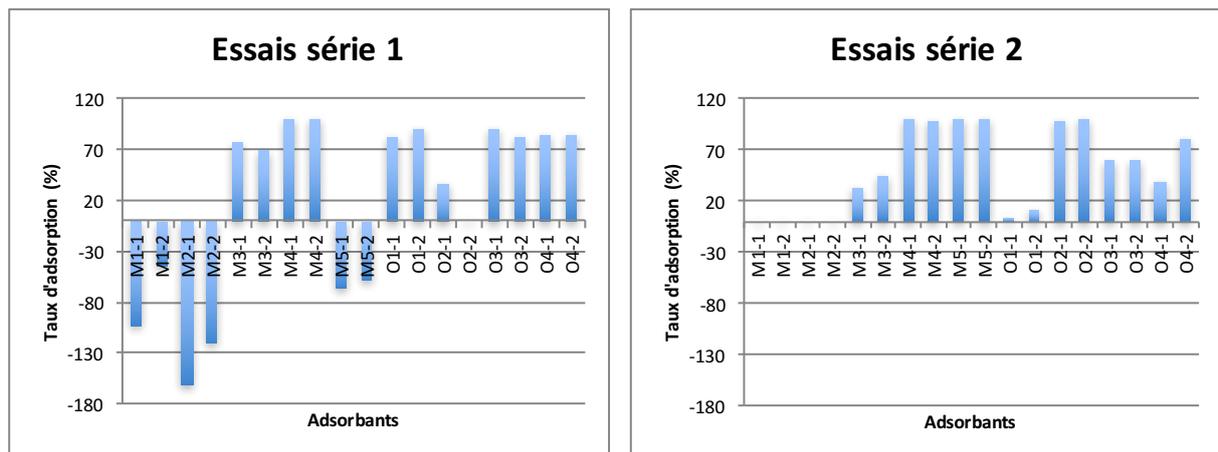


Figure IV-6 : Résultats des essais d'adsorption du chlorpyrifos-éthyl / Pyrinex à la dose homologuée de 500 ng/μL dans l'eau (Annexe 2)

Légende : M1-M2 résines 3000 mg (N°1)

M3-M4 charbons, M5 bentonite, O1 amidon, O3-O4 protéines végétales 1500 mg (N°1) et 150 mg (N°2)
O2 Chitosan 6000 mg dans 100 mL (N°1) et 600mg (N°2)

Dans le cas des adsorbants M1, M2 et M5 de la série d'essais N°1, les taux d'adsorption sont négatifs : la teneur résiduelle en chlorpyrifos est supérieure à la teneur initiale moyenne. La formule commerciale du chlorpyrifos se présente sous la forme d'un liquide de viscosité importante dans lequel l'actif est en suspension sous la forme de capsules. L'hypothèse a été émise selon laquelle les molécules formant la capsule aient pu être adsorbées et une conséquence pourrait être une augmentation de la quantité de chlorpyrifos dans l'eau soit due à un effet de compétition, soit due à une libération plus importante du chlorpyrifos par affaiblissement des liaisons dans les capsules au fur et à mesure que celles-ci sont captées par l'adsorbant. Les résines M1 et M2 ont été éliminées des essais. En revanche, la bentonite M5 dont les propriétés adsorbantes, notamment dans le cas des phytosanitaires, sont reconnues, a été intégrée dans la série d'essais N°2 pour laquelle les

quantités d'adsorbants ont été réduites d'un facteur 10. Les taux d'extraction atteignent alors 100 % : tout le chlorpyrifos libéré dans l'eau a été adsorbé par la bentonite sans qu'il y ait de concurrence avec les autres molécules de la formulation. Pour le chitosan O2, comme pour la bentonite M5, les rendements d'extraction sont meilleurs (99 %) pour des quantités de supports plus faibles. Examinons ces deux adsorbants dont la particularité est de gonfler en milieu aqueux. Une deuxième hypothèse peut être avancée : plus la quantité d'adsorbant augmente et plus le volume d'eau de la phase liquide diminue (gonflement des supports), limitant la mobilité du chlorpyrifos et des échanges avec les phases solides. Notons à ce sujet, que seule la bentonite a été préparée (gonflement des feuillets d'argile dans l'eau 24 heures avant les essais). Le chitosan a été utilisé directement. Pour la série d'essais N°1 dans lequel il a été introduit à 6000 mg, il a fallu travailler avec 100 mL au lieu de 30 mL de Pynex car il n'y avait pas suffisamment de phase liquide.

Concernant les supports de charbon activé (M3), d'amidon (O1) et de protéines de pois et de soja (O3, O4), les taux d'extraction obtenus dans la série d'essais N°1 sont supérieurs à ceux de la série N°2 : plus la quantité augmente et meilleur est le taux d'extraction. Dans le cas du charbon M4 dont la granulométrie est très fine, 100 % d'extraction sont atteints quelle que soit la quantité de support (1500 mg - série N°1 ou 150 mg - série N°2).

Etant donné que les teneurs résiduelles en phytosanitaires dans les pommes sont nettement inférieures aux doses homologuées appliquées dans les vergers, une deuxième campagne d'essais a été réalisée en diminuant la concentration du Chlorpyrifos-Et dans la phase aqueuse à 0,5 ng/μL. Les résultats sont présentés dans la Figure IV-7.

La plupart des rendements d'extraction sont négatifs. A ce niveau de dose, soit la plupart des adsorbants est inefficace dans les conditions de traitement, soit la concentration étudiée est trop proche de la limite de quantification de la méthode par CPG/DIF et la différence entre la dose initiale et la dose restante n'est pas significative. Toutefois, dans ces mêmes conditions, les supports M3 et M4 semblent avoir adsorbé le chlorpyrifos (rendement d'extraction de 100 %). En parallèle, les phytosanitaires adsorbés sur les supports ont été récupérés par une extraction solide/liquide en milieu solvant pour analyse. Le chlorpyrifos n'a été détecté dans aucun support après extraction. Il est possible que, si ces supports ont adsorbé les résidus, il soit plus difficile de les désorber.

Compte tenu des résultats, il a été décidé d'augmenter la concentration de Chlorpyrifos-Et en phase aqueuse à 10 ng/μL. Seule une sélection de supports adsorbants a été étudiée, à deux temps de contact distincts 15 minutes et 1 heure. Les résultats sont présentés dans la Figure IV-7. Dans cette série également, la majorité des taux d'extraction est négative. La dose de chlorpyrifos étudiée reste faible et les incertitudes sont d'autant plus importantes. Notons toutefois que les taux tendent à s'améliorer lorsque la durée de contact augmente.

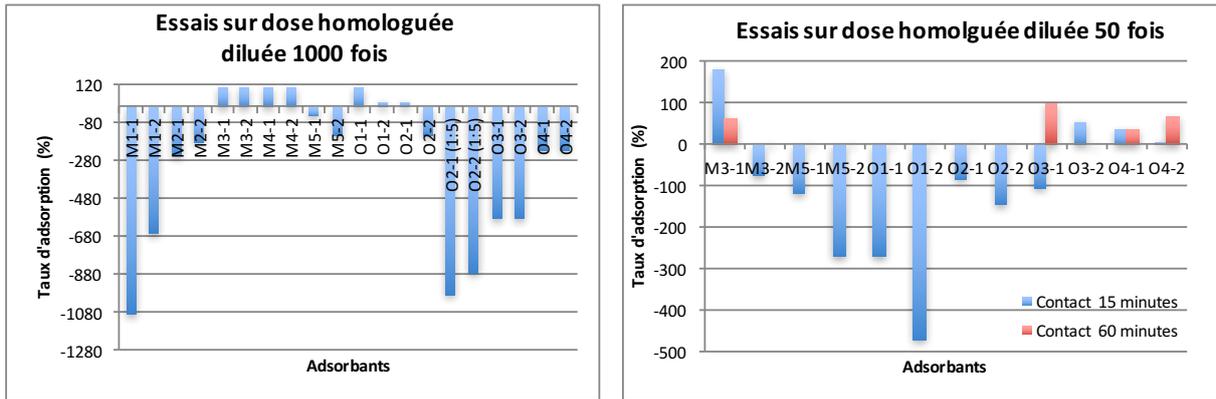


Figure IV-7 : Résultats des essais d'adsorption du chlorpyrifos-éthyl / Pyrinex à 0,5 ng/µL et à 10 ng/µL dans l'eau (Annexes 3 et 4)

Légende : M1-M2 résines 3000 mg,

M3-M4 charbons actifs, M5 bentonite, O1 amidon, O3-O4 protéines végétales 150 mg,

O2 chitosan 600 mg et O2 (1 :5) 60 mg

3. 1. 2. Rendements d'extraction du fludioxonil/Geoxe par les supports adsorbants

Les histogrammes de la Figure IV-8 représentent les taux d'extraction du fludioxonil par les supports adsorbants solides pour une concentration initiale de 400 ng/µL dans l'eau (= dose homologuée). Les deux séries d'essais ont été mises en œuvre, correspondant à des masses d'adsorbants décroissantes d'un facteur 2,5 pour M1, M2 et O2 jusqu'à 10 pour les autres adsorbants de la série N°1 à la série N°2 (Cf. Tableau IV-3, § 2. 3. 2).

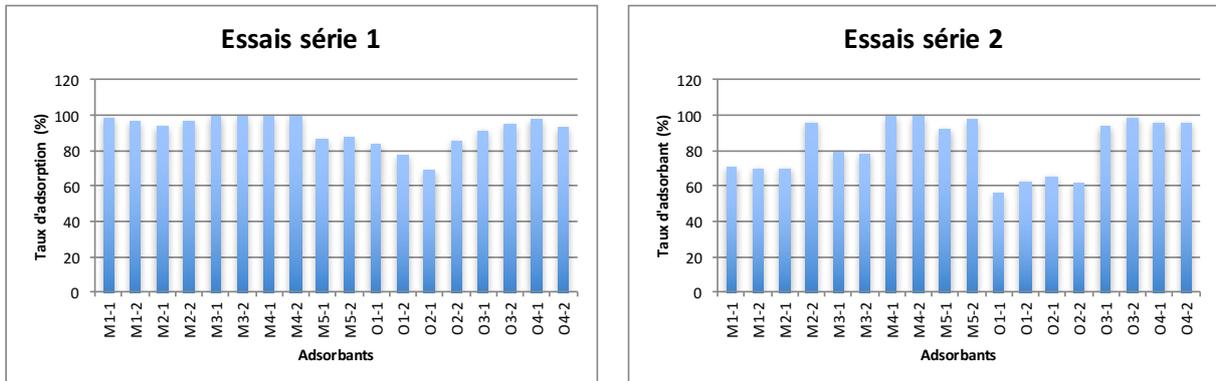


Figure IV-8 : Résultats des essais d'adsorption du fludioxonil / Geoxe à 400 ng/µL dans l'eau (Annexe 5)

Légende : M1-M2 résines 3000 mg (N°1) et 1200 mg (N°2)

M3-M4 charbons, M5 bentonite, O1 amidon, O3-O4 protéines végétales 1500 mg (N°1) et 150 mg (N°2)

O2 Chitosan 600 mg (N°1) et 240 mg (N°2)

Dans le cas des supports M1, M2, M3, O1 et O2, plus la quantité de support augmente, plus l'extraction est efficace. Les taux dépassent 95 % sauf pour O1 (81 %) et O2 (77 %). Concernant la bentonite M5 hydrophile dont les propriétés de gonflement dans l'eau sont très élevées, le rendement d'extraction est meilleur (95 %) pour des quantités faibles de support (série N°2). Les rendements d'extraction obtenus avec les protéines de pois et de soja O3 et O4 semblent indépendants de la quantité d'adsorbant utilisé pour extraire le fludioxonil. Le charbon actif M4, très adsorbant et de granulométrie très fine, est efficace à 100 % quelle que soit la quantité.

3. 1. 3. Rendements d'extraction du flonicamid/Teppeki par les supports adsorbants

Les histogrammes de la Figure IV-9 représentent les taux d'extraction du flonicamid par les supports adsorbants solides pour une concentration initiale de 140 ng/μL dans l'eau (= dose homologuée). Les deux séries d'essais ont été mises en œuvre, correspondant à des masses d'adsorbants décroissantes d'un facteur 7,5 pour M1, M2 et O2 jusqu'à 10 pour les autres adsorbants de la série N°1 à la série N°2 (Cf. Tableau IV-3, § 2. 3. 2).

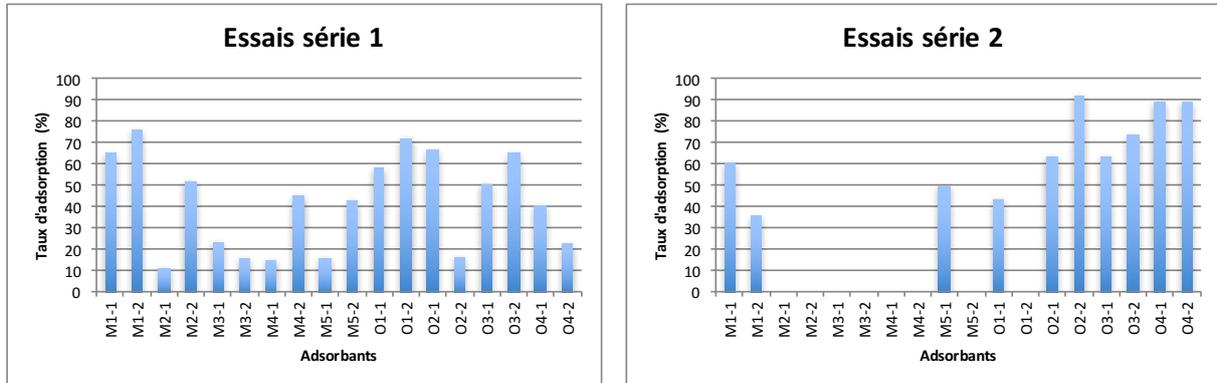


Figure IV-9 : Résultats des essais d'adsorption du flonicamid / Tepeki à 140 ng/μL dans l'eau (Annexe 6)

Légende : M1-M2 résines 3000 mg (N°1) et 420 mg (N°2)

M3-M4 charbons, M5 bentonite, O1 amidon, O3-O4 protéines végétales 1500 mg (N°1) et 150 mg (N°2)

O2 Chitosan 600 mg (N°1) et 80 mg (N°2)

Le flonicamid, molécule plutôt polaire, répond mal en CPG/DIF (étalonnage quadratique). Certaines des aires mesurées se sont avérées hors gamme et si l'échantillon est dilué, la molécule n'est plus détectée. Dans les échantillons M2, M3, et M4 de la série d'essais N°2, le flonicamid n'a pas pu être quantifié. Dans les échantillons M5 et O1 de la série d'essais N°2, un essai sur deux n'a pas pu être quantifié.

Globalement, l'efficacité des adsorbants vis-à-vis du flonicamid est très variable. Elle est plus faible que pour tous les autres phytosanitaires. A l'exception de la résine M1, il semble que moins il y a d'adsorbant, meilleure est l'extraction avec au maximum 92 % pour le chitosan O2 et la protéine de soja O4 à 80 et 150 mg respectivement (série N°2).

3. 1. 4. Rendements d'extraction du Boscalid-Pyraclostrobine/Bellis par les supports adsorbants

La Figure IV-10 représente les taux d'extraction du boscalid et de la pyraclostrobine par les supports adsorbants solides pour une concentration initiale de 800 ng/μL dans l'eau (= dose homologuée). Les deux séries d'essais ont été mises en œuvre, correspondant à des masses d'adsorbants décroissantes d'un facteur 2,5 pour M1, M2 et O2 jusqu'à 10 pour les autres adsorbants de la série N°1 à la série N°2 (Cf. Tableau IV-3, § 2. 3. 2).

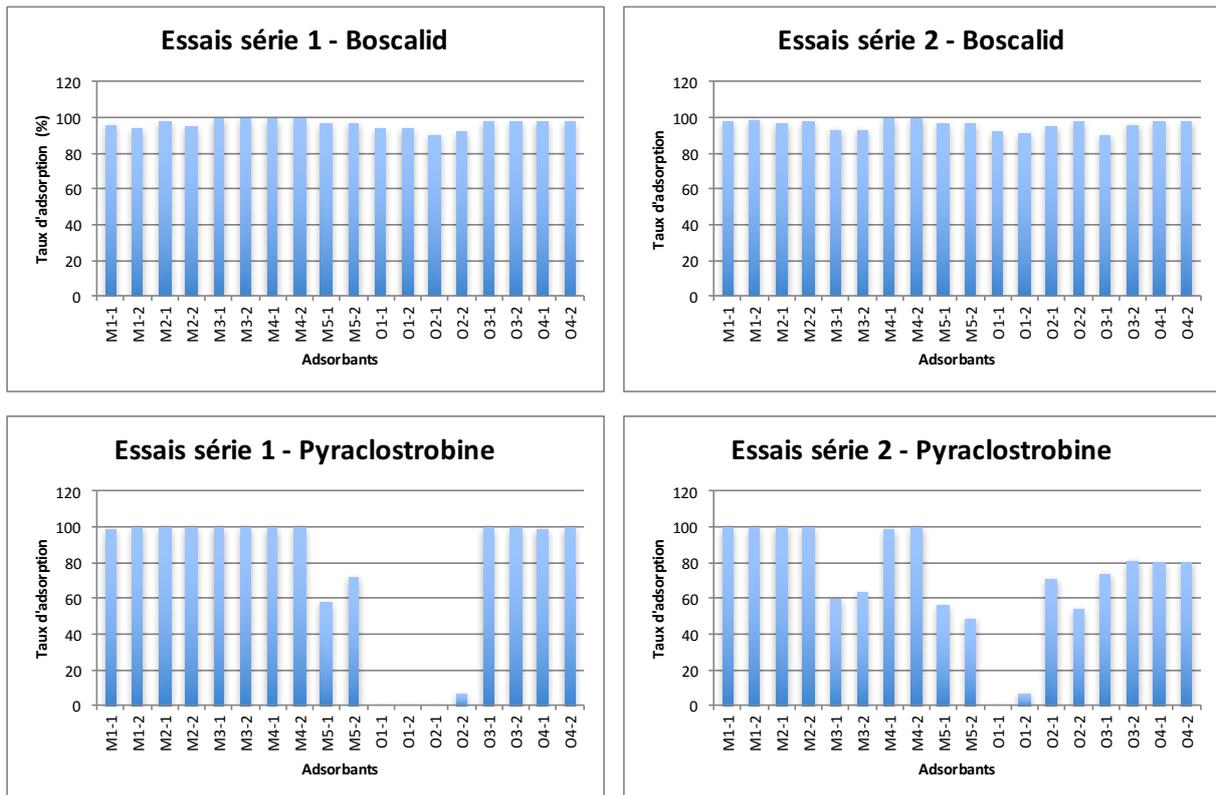


Figure IV-10 : Résultats des essais d'adsorption du boscalid et de la pyraclostrobine / Bellis à 800 ng/ μ L dans l'eau (Annexe 7)

Légende : M1-M2 résines 3000 mg (N°1) et 1200 mg (N°2)

M3-M4 charbons, M5 bentonite, O1 amidon, O3-O4 protéines végétales 1500 mg (N°1) et 150 mg (N°2)

O2 Chitosan 600 mg (N°1) et 240 mg (N°2)

Les adsorbants sont tous très efficaces quelle que soit la quantité de support pour l'extraction du boscalid. Tous les taux sont supérieurs à 91 %.

En revanche, la pyraclostrobine est plus difficile à extraire. La quantité de supports doit être élevée pour une extraction optimale (M1, M2, M3, M4, O3 et O4 de la série d'essais N°1). Pour M4 de granulométrie très fine, l'extraction à 100 % est atteinte dès 150 mg de support. Concernant le chitosan O2, qui gonfle dans l'eau, il est d'une meilleure efficacité à 240 mg qu'à 600 mg. Quant à la bentonite M5, les résultats sont légèrement meilleurs avec 1500 mg (série N°1) qu'avec 150 mg (série N°2). Seul l'amidon O1 est inefficace, quelle que soit la quantité utilisée.

3. 1. 5. Bilan des résultats des essais d'évaluation des supports adsorbants solides

Les résultats sont représentatifs des conditions opératoires choisies, fixées arbitrairement en fonction des contraintes industrielles relatives au temps et à la température. Ils ne constituent pas nécessairement des données à l'équilibre.

Le diagramme bulle de la Figure IV-11 permet de comparer l'efficacité des supports adsorbants solides en fonction de la quantité de support (bulles plus ou moins grandes) et du caractère lipophile du phytosanitaire (coefficient de partage octanol/eau $\log K_{O/E}$).

Ce diagramme met en évidence que **l'extraction des molécules dont le caractère hydrophile/hydrophobe ($\log K_{O/E}$) se situe aux extrêmes (- 0,24 pour le flonicamid et 4,7 pour le chlorpyrifos) est plus difficile. Et elle l'est d'autant plus pour le flonicamid, qui est le composé le plus hydrophile. Pour les autres phytosanitaires et en particulier le boscalid, de nombreux supports**

ont extrait jusqu'à 100 % des quantités initialement présentes en solution. Le boscalid, la pyraclostrobine et le fludioxonil comportent au minimum deux cycles aromatiques et des hétéroatomes portant des doublets libres (N, O, F, Cl). Ils peuvent donc interagir avec les adsorbants en formant des liaisons hydrogène et/ou par des interactions hydrophobes. Les molécules de flonicamid et de chlorpyrifos ne renferment qu'un seul cycle aromatique. Il y aura moins d'interactions hydrophobes que pour les autres molécules : les taux d'adsorption seront donc plus faibles.

Dans cette étude, **les supports adsorbants solides ont tous montré une efficacité notable.** En règle générale, **plus la quantité d'adsorbant est élevée, meilleure est l'efficacité.** En revanche, **dans le cas des supports hydrophiles qui ont tendance à s'hydrater et à gonfler fortement dans l'eau, il sera plus pertinent d'utiliser des quantités plus faibles pour augmenter l'efficacité.**

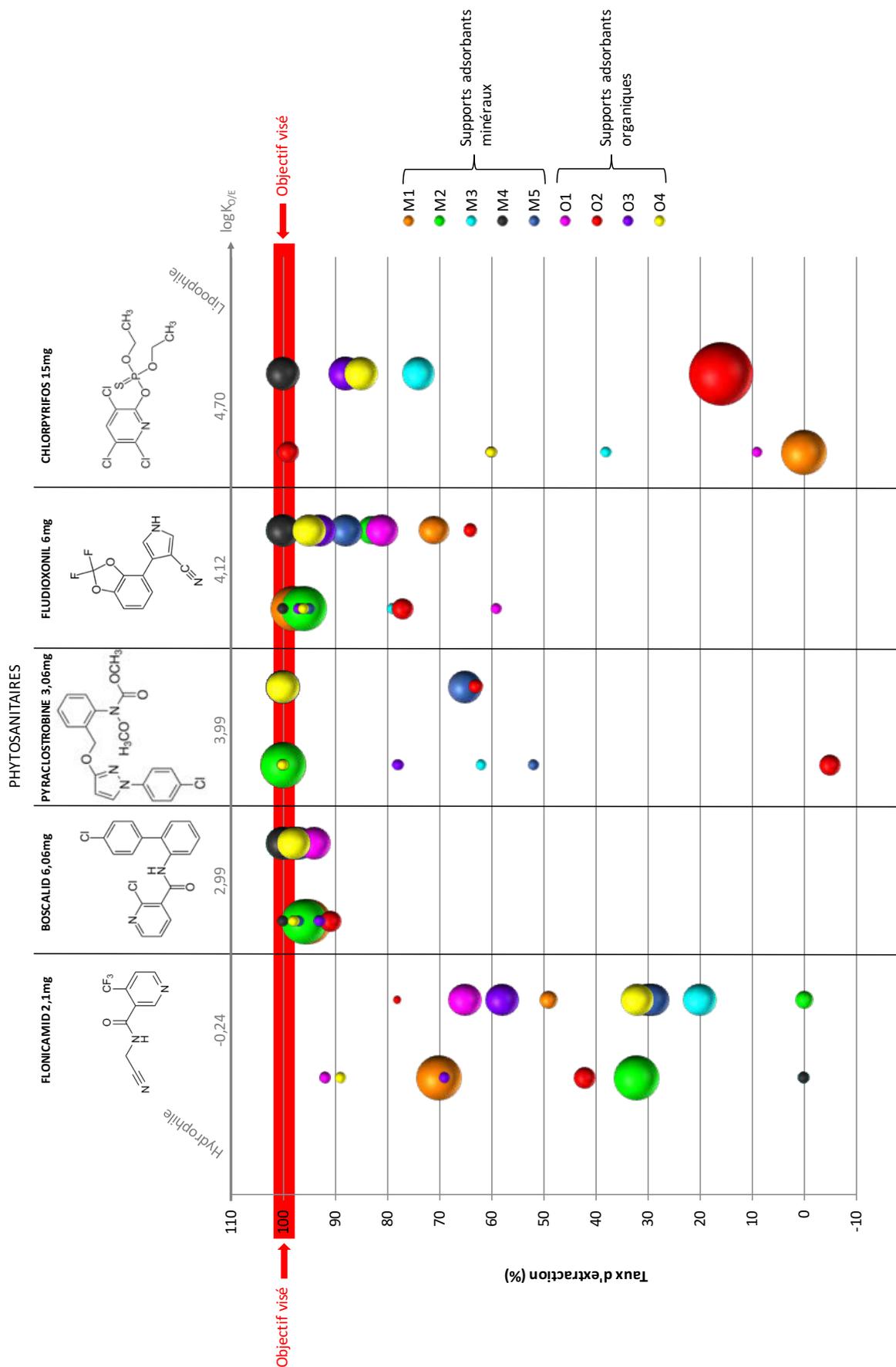


Figure IV-11 : Diagramme bulle représentant le taux d'extraction en fonction de la quantité d'adsorbants (surface des bulles) et du caractère lipophile des phytosanitaires ($\log K_{ow}/E$)

3. 2. Evaluation des supports adsorbants filmogènes

Une fois adsorbées, les molécules de phytosanitaires diffusent dans la cuticule et se désorbent au niveau de sa paroi interne, vers les membranes pectocellulosiques et le cytoplasme des cellules de l'épiderme qui constituent le compartiment de sorption (Cf. § I- 3. 1. et I- 3. 4.) (Wild *et al.* 2004 [9]). La contribution des polysaccharides dans la pénétration des phytosanitaires est primordiale. Dans cette deuxième phase d'évaluation de supports, une sélection de polysaccharides a donc été testée (Cf. Tableau IV-6 § 2. 4. 1.). Leurs propriétés gélifiantes ont été utilisées pour recouvrir la surface des pommes contaminées d'un film aux propriétés adsorbantes (Cf. protocole § 2. 4.). La variété Fuji (variété 2) a été choisie pour des raisons de disponibilité au moment de l'évaluation et ses caractéristiques physico-chimiques intermédiaires entre la Gala et la Pink Lady® (Cf. Chapitre II).

Le principe de cette évaluation consiste à contaminer des pommes et à les décontaminer après un temps variable fixé (24 heures puis 10 jours) par application des films de traitement. Une étude préliminaire de faisabilité est présentée dans un premier temps. Les pommes ont été contaminées avec un mélange de Geoxe et de Pyrinex (fludioxonil + chlorpyrifos-éthyl). Une solution de gommes est appliquée 24 heures après. Les quantités de phytosanitaires sont évaluées dans les bains de décontamination et dans les épidermes. Les résultats sont discutés. Dans un second temps, les différents supports polysaccharidiques filmogènes sélectionnés ont été évalués sur des pommes contaminées avec du Bellis (boscalid + pyraclostrobine). En effet, la fréquence de traitement des pommes Fuji ayant servi à cette étude par Bellis a été plus importante que par Geoxe. Les teneurs en boscalid et en pyraclostrobine devraient être plus élevées que celles du fludioxonil. Le chlorpyrifos n'a pas été détecté. Après contamination, les pommes renferment en moyenne 1,5 mg de boscalid et 11 mg de pyraclostrobine par kg d'épiderme (Cf. § 2. 4. 8.). Les résultats sont exprimés en taux d'extraction des phytosanitaires par rapport aux valeurs moyennes de référence. Une dernière évaluation a été effectuée sur des pommes en sortie de conditionnement, présentant des teneurs initiales en boscalid et en pyraclostrobine bien inférieures à 1,5 et 11 mg/kg d'épiderme. En conclusion, un bilan est dressé et les interactions phytosanitaires-cuticule-agent filmogène désorbant sont discutées.

3. 2. 1. Résultats des essais préliminaires de décontamination des pommes de la variété 2

Cette première série d'essais sur les pommes Fuji (variété 2) a été réalisée à partir d'une contamination par un mélange Geoxe+Pyrinex (Fludioxonil+Chlorpyrifos-Et). La décontamination a été réalisée 24 heures après la contamination par application au pinceau d'une solution de gomme arabique additionnée de gomme Karaya pour faciliter le filmage (S1+S6), avec et sans rinçage préalable du fruit (prélavage H₂O). Le témoin équivaut à la pomme contaminée puis lavée (témoin H₂O). Il n'a pas été réalisé de dosage sur la pomme après contamination (témoin contamination sans lavage). Pour ces essais, les bains de nettoyage ont été également analysés. Tous les résultats figurent dans le Tableau IV-22.

Echantillon	Quantité / bain (mg/L de solution de lavage)		Quantité restante / peau (mg/kg d'épiderme)	
	Fludioxonil	Chlorpyrifos-Et	Fludioxonil	Chlorpyrifos-Et
Témoin H2O	1,0	0,2	0,5	5,2
Prélavage H2O	0,7	0,2	3,6	6,7
+ S1+S6	0,4	0,2		
S1+S6	0,6	0,4	0,3	6,4

Tableau IV-22 : Résultats des essais préliminaires de décontamination des pommes (Variété 2)

Les deux phytosanitaires sont peu solubles dans l'eau mais la solubilité du fludioxonil en phase aqueuse est jusqu'à 5 fois plus élevée que celle du chlorpyrifos. Toutes les valeurs résiduelles de chlorpyrifos dans l'épiderme des pommes sont élevées. De plus, il n'y a pas de différence significative entre les teneurs évaluées pour le témoin H2O et pour les pommes traitées par les solutions S1+S6. Si la solubilité du chlorpyrifos est quasiment nulle en milieu aqueux, il est probable que la teneur mesurée dans l'épiderme du témoin H2O soit représentative de la valeur de chlorpyrifos apportée par l'étape de contamination avec le Pynex. Par conséquent, la solution S1+S6 n'a pas d'effet de décontamination sur le chlorpyrifos. Dans le cas du fludioxonil, les teneurs résiduelles sont très variables : il apparaît un facteur 12 entre les valeurs mesurées dans les épidermes des deux échantillons traités avec et sans prélavage à l'eau des pommes avant application du film. Il est probable que cette variabilité provienne d'une pénétration inégale du Geoxe dans la cuticule des pommes lors de l'étape de contamination. Par conséquent, il est difficile de conclure sur l'efficacité de la solution S1+S6 dans le cas du fludioxonil.

3. 2. 2. Résultats des essais de décontamination par supports adsorbants filmogènes 24 heures après la phase de contamination

Les teneurs en boscalid et pyraclostrobine après décontamination par les supports adsorbants liquides filmogènes ont été évaluées 24 heures après la contamination des pommes (variété 2) par Bellis (Annexe 8).

Les histogrammes de la Figure IV-12 représentent les taux d'extraction des résidus obtenus pour les différents traitements.

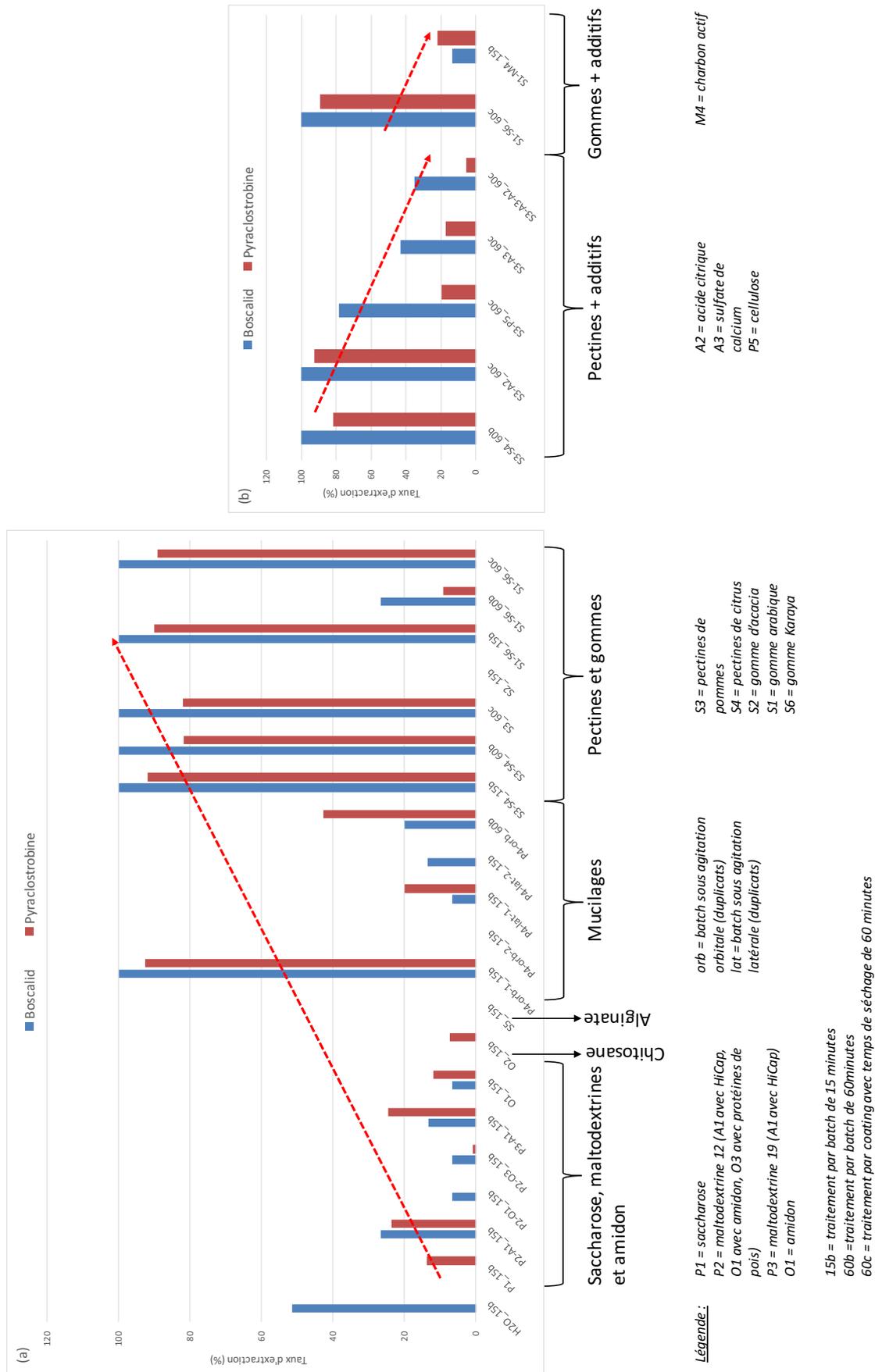


Figure IV-12 : Taux d'extraction du boscalid et de la pyraclostrobine par différents traitements à base de (a) polysaccharides et (b) pectines et gommages additivés, 24 heures après l'application de la contamination par Bellis sur les pommes (variété 2)

Les traitements mettant en œuvre le saccharose (P1), les maltodextrines (P2 et P3), l'amidon (O1), le chitosane (O2) et l'alginate de sodium (S5) extraient moins de 30 % des phytosanitaires présents dans l'épiderme des pommes (Figure IV-12, (a)). Ces résultats sont inférieurs à l'action de l'eau dans le cas du boscalid dont 50 % sont déjà éliminés. Contrairement au boscalid (4,6 mg/L à 20°C à pH7), la pyraclostrobine est moins hydrosoluble (1,9 mg/L à 20°C à pH5) et le lavage à l'eau n'élimine aucun résidu de pyraclostrobine. L'efficacité des traitements à base de mucilage de lin (P4), atteignant pourtant 100 % lors du premier essai (P4-orb-1_15b), n'a finalement pas été confirmée dans les réplicats suivants. Cela ne semble pas lié au mode d'agitation du batch (orbital ou latéral). Les conditions d'extraction du mucilage des graines de lin n'ont pas été optimisées et la composition des mucilages n'a pas été déterminée. En l'absence de ces données, nous avons supposé que les différents extraits réalisés pour ces évaluations pouvaient ne pas être strictement identiques, générant ainsi des résultats très variables. En revanche, les taux d'extraction évalués pour les traitements à base de pectines (S3, S4) et de gommes (S1, S6) sont nettement supérieurs à celui de l'eau. Ils atteignent 100 % pour le boscalid dans les traitements suivants : pectines en batch de 15 et 60 minutes et en coating, ainsi que les gommes en batch de 15 minutes et en coating. L'élimination de la pyraclostrobine est nettement significative dans ces traitements (plus de 80 % éliminés contre 0 % par l'eau). Il est intéressant de noter que ni la durée ni le mode d'application des traitements n'ont d'influence sur les taux d'extraction dans le cas des pectines uniquement (aucune pour le boscalid et non significative pour la pyraclostrobine). Par contre, dans le cas des gommes appliquées en batch d'une durée de 60 minutes, les résultats sont nettement inférieurs à ceux obtenus pour les traitements en batch de 15 minutes ou par coating. Les taux d'extraction tombent à 30 % pour le boscalid et à 10 % pour la pyraclostrobine. Ce résultat est surprenant compte tenu du fait que le traitement par coating dont la durée de séchage a été fixée à 60 minutes permet d'atteindre les mêmes taux d'extraction que le batch de 15 minutes. Il est possible que lors du traitement par batch, les échanges entre l'épiderme et la solution de décontamination soient plus dynamiques que lors du filmage et par conséquent, augmenter la durée du batch entraîne un partage finalement plus favorable vers les polysaccharides de l'épiderme que vers la solution S1-S6. Cette tendance peut aussi être observée dans le cas des pectines en batch sur le taux d'extraction de la pyraclostrobine qui diminue de 92 à 82 % lorsque la durée est multipliée par 4. Une autre hypothèse réside dans les propriétés de gonflement et de gélification des gommes et des pectines au cours du temps. Il est possible que ce changement de texture diminue la mobilité de la pyraclostrobine qui ayant une affinité pour la cuticule plus prononcée que celle du boscalid ($\log K_{O/E}$ plus grand), tend à y rester. Notons que la gomme d'acacia (S2 en batch de 15 minutes), qui se présente comme la gomme arabique, n'a extrait aucun résidu, ni de boscalid, ni de pyraclostrobine. Dans le cas des gommes végétales naturelles, il est particulièrement difficile de connaître avec précision la composition chimique. La seule remarque ici est que, à concentration dans l'eau identique, la gomme d'acacia était très liquide. Elle ne doit donc pas contenir les mêmes composés chimiques que la gomme arabique utilisée dans l'étude.

Dans un second temps, nous avons sélectionné les gommes et les pectines pour y ajouter des additifs, soit pour augmenter la gélification dans le cas des pectines, soit pour évaluer l'action combinée des agents filmogènes et des adsorbants solides (P5 cellulose et M4 charbon actif pulvérulent) (Figure IV-12, (b)). L'ajout d'additifs se solde systématiquement par une baisse significative de l'extraction des résidus de boscalid et de pyraclostrobine.

En conclusion, les pectines et les gommes (S1+S6 et S3 ou S4) doivent présenter des fonctions actives dans le processus de décontamination. L'ajout d'adsorbant solide M4 ou P5 en saturant les sites actifs des composés des supports liquides filmogènes inhibe leur action adsorbante. La viscosité semble également intervenir dans le processus peut-être en limitant la mobilité du système, auquel cas il faudrait augmenter considérablement la durée de contact. En effet, dans le cas particulier des pectines (S3), l'ajout d'additif A2 et A3 pour augmenter leur gélification, diminue son efficacité de 100 à 35 % pour le boscalid et de 92 à 5 % pour la pyraclostrobine. La pyraclostrobine est toujours la plus affectée lors de la diminution de l'efficacité du procédé. Les gommes arabique (S1) et d'acacia (S2) sont des gommes naturelles végétales extraites de la même espèce d'arbre : l'acacia. Il est plus probable que les variétés d'acacias à partir desquelles ont été extraits S1 et S2 soient plus en cause que la viscosité dans ce cas précis. La viscosité est une conséquence de la variation de la composition entre les deux gommes. Il est important de noter que la gomme arabique (S1) a toujours été combinée à la gomme Karaya (S6) qui lui confère probablement ses propres propriétés dans le processus d'extraction.

3. 2. 3. Résultats des essais de décontamination par supports adsorbants filmogènes 10 jours après la phase de contamination

Les teneurs en boscalid et pyraclostrobine après décontamination par les supports adsorbants filmogènes ont été évaluées 10 jours après la contamination des pommes (variété 2) par Bellis (Annexe 9). Les traitements à base des gommes, des pectines et de l'alginate ont été sélectionnés dans cette deuxième phase de l'évaluation des supports filmogènes.

Les histogrammes de la Figure IV-13 représentent les taux d'extraction des résidus obtenus pour les différents traitements.

Globalement les taux d'extraction après 10 jours sont inférieurs à ceux obtenus dans l'étude de décontamination après 24 heures (Figure IV-13, A). Dans ces conditions, le boscalid n'est quasiment plus extrait : les taux sont inférieurs à 10 % pour des durées de contact de 15 minutes. Il semble n'être plus disponible. La pyraclostrobine est moins bien extraite : les taux diminuent de 80-90 % dans le cas de l'étude à 24 heures à des taux inférieurs en moyenne à 50 % après 10 jours. Elle est moins disponible qu'après 24 heures mais reste accessible à la décontamination. Dans le cas de la décontamination après 10 jours, les taux d'extraction de la pyraclostrobine sont supérieurs à ceux du boscalid. Cela indique que la disponibilité du boscalid est devenue beaucoup plus faible que celle de la pyraclostrobine en 10 jours. Dans ces conditions, les supports adsorbants sont donc globalement moins efficaces.

Les durées de batch ont donc été multipliées par 4 (Figure IV-13, B). Dans ces conditions, les taux de décontamination augmentent significativement et le boscalid est de nouveau extrait jusqu'à 42 % par les pectines (S3/S4). Globalement, la pyraclostrobine reste mieux extraite que le boscalid. Notons que pour une décontamination survenant 24 heures après la contamination des pommes, la durée de contact de 15 minutes était favorable à une meilleure extraction des composés, surtout de la pyraclostrobine. Pour une décontamination survenant 10 jours, plus la durée des traitements augmente, meilleure est l'extraction (Figure IV-13, B).

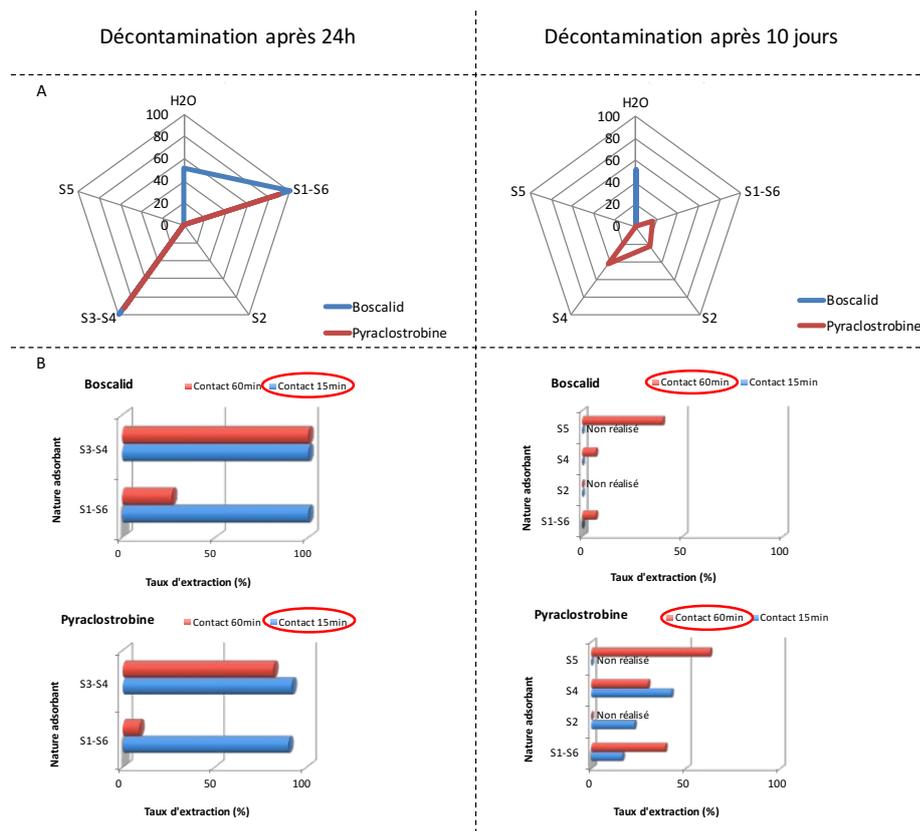


Figure IV-13 : Comparaison des taux d'extraction du boscalid de la pyraclostrobine (A) par les traitements en batch de 15 minutes à base de gommes (S1-6, S2), de pectines (S3 ou S4) et d'alginate (S5), appliqués 24 heures après et 10 jours après la contamination des pommes par Bellis (Variété 2). (B) Effet de l'augmentation de la durée du batch.

Parmi les supports adsorbants filmogènes qui ont été testés, certains se sont avérés plus efficaces que d'autres. L'hypothèse de sites actifs jouant un rôle dans l'extraction des résidus dans la matrice a été émise. Les supports sélectionnés dans cette étude sont tous de nature polysaccharidique. Les supports P1 (saccharose), P2, P3 (maltodextrines) et P5 (cellulose) sont des polysaccharides neutres tandis que les supports P4 (mucilages), S1 (gomme arabique), S2 (gomme d'acacia), S3/S4 (pectines, pommes/citrus), S5 (alginate) et S6 (gomme Karaya) sont des polysaccharides chargés (acides carboxyliques). Ils présentent tous un motif de type acide : galacturonique, glucuronique, guluronique ou mannuronique. Les pectines S3/S4 sont caractérisées par un squelette d'acide galacturonique. L'alginate S5 est caractérisé par un squelette de deux monomères : l'acide mannuronique et l'acide guluronique. Le monomère des gommes d'acacia S1 et S2 est composé d'acide glucuronique. La gomme Karaya S6 contient de l'acide galacturonique et de petites quantités d'acide glucuronique. Enfin le mucilage de lin P4 est composé de polysaccharides de nature pectique : il contient donc de l'acide polygalacturonique.

L'hypothèse d'une réactivité liée à la quantité de fonctions acides donc de charges négatives dans les supports filmogènes peut donc être avancée. Selon cette hypothèse, l'efficacité d'extraction pourra être améliorée en sélectionnant des pectines à bas degré de méthylation.

Toutefois, dans la mesure où les molécules phytosanitaires résident dans la peau des fruits depuis l'épandage jusqu'au calibrage et au conditionnement, qui peuvent intervenir bien après la récolte, la progression des phytosanitaires vers les couches les plus internes de la cuticule sera plus avancée encore que celle identifiée 10 jours après contamination. Afin de vérifier cela, il a été procédé à un

essai de décontamination de pommes de la variété 2 par les pectines S4 en sortie de conditionnement.

3. 2. 4. Résultats des essais de décontamination de pommes en sortie de conditionnement par supports adsorbants filmogènes

Les teneurs résiduelles en boscalid et en pyraclostrobine ont été évaluées par CPG/SM dans les épidermes de pommes Fuji en sortie de conditionnement dans la mesure où elles ont été plus fréquemment traitées par du Bellis en pré-récolte. Les teneurs ont ensuite été mesurées après traitement par les pectines citrus (S4) en batch (15 et 60 minutes) (Tableau IV-23).

Echantillon	Boscalid (mg/kg de peaux)	Pyraclostrobine (mg/kg de peaux)
Blanc matrice	0,2	nd (< 0,08)
V2-conditionnement-S4 batch 15min	0,2	nd (< 0,08)
V2-conditionnement-S4 batch 60min	0,3	nd (< 0,08)

Tableau IV-23 : Evaluation par CPG/SM des teneurs en boscalid et en pyraclostrobine dans l'épiderme des pommes en sortie de conditionnement (Variété 2) avant et après traitement par pectines

Légende : nd non détecté

Dans cet essai, aucun résidu de boscalid n'a été extrait par le traitement à base de pectines, même après une heure de contact. Les pectines avaient extrait 100 % du boscalid 24 heures après la contamination mais aucun résidu 10 jours après, pour une durée de contact de 15 minutes. En augmentant la durée de contact à 60 minutes, 7 % de boscalid avaient alors pu être extraits (Figure IV-13, B). Dans le cas de pommes en sortie de conditionnement, le délai de 10 jours entre l'application du traitement et l'étape de décontamination est fortement dépassé. Il aurait sans doute fallu augmenter considérablement la durée de contact du traitement pour extraire une partie du boscalid détecté dans le blanc matrice. En conclusion, les supports adsorbants n'ont aucune efficacité dès lors que les molécules ont pénétré dans les couches plus internes de la cuticule.

3. 2. 5. Bilan des résultats des essais d'évaluation des supports adsorbants filmogènes

Sur l'ensemble des essais réalisés avec le chlorpyrifos, le fludioxonil, la boscalid et la pyraclostrobine, 24 heures après contamination, il a été observé que :

- plus le coefficient de partage octanol-eau ($\log K_{O/E}$) est faible et plus la quantité de résidus éliminés par l'eau de lavage est importante (Boscalid > Pyraclostrobine, Fludioxonil > Chlorpyrifos-Et) : la solubilité des molécules dans l'eau est plus élevée ;
- plus le $\log K_{O/E}$ est faible, plus le traitement à base de supports filmogènes est efficace ;
- plus le support filmogène est chargé négativement, meilleure est l'efficacité d'extraction : S3/S4, S1, S6 ;
- l'ajout de supports adsorbants solides ou la gélification du support filmogène diminue l'efficacité d'extraction : dans un cas, les supports solides doivent adsorber les polysaccharides diminuant pour les deux la quantité de sites réactionnels et dans l'autre, la gélification induit une diminution des fonctions acides libres (S3+A2+A3, S3+A3, S5).

Dix jours après la contamination, il a été observé que :

- l'eau n'a plus d'effet quel que soit le $\log K_{O/E}$ du phytosanitaire,
- plus le $\log K_{O/E}$ est bas, moins le traitement à base de supports filmogènes est efficace,

Quel que soit le délai entre la contamination et la décontamination (24 heures dans l'essai préliminaire au § 3. 2. 1. et 3 semaines dans un essai complémentaire avec des pommes Gala dont les résultats se trouvent en annexe 9), il a été observé que pour des molécules très lipophiles comme le chlorpyrifos, les traitements ne sont pas efficaces.

La force d'adhésion d'un composé phytosanitaire à la surface très lipophile de la peau des fruits peut en quelque sorte être représentée par le coefficient de partage cuticule-eau (Cf. § 1-3. 1.). Ce coefficient de partage est considéré comme similaire au $\log K_{O/E}$ (Riederer et Schreiber 1995 [10]). Plus le $\log K_{O/E}$ est bas, plus la liaison sera considérée comme faible ; plus le $\log K_{O/E}$ est élevé, plus la liaison sera estimée forte. **Au cours du temps, les composés aux $\log K_{O/E}$ les plus bas pénètrent la cuticule car ils n'ont pas d'affinité. Ils ne sont alors plus accessibles aux traitements. Les composés aux $\log K_{O/E}$ plus forts sont en forte interaction avec la cuticule (Cf. § 1-3. 4.) (Liu 2004 [11]). Ils restent dans une zone encore accessible aux traitements à condition que l'affinité ne soit pas trop forte et qu'ils puissent être désorbés. Dans le cas d'une affinité très importante (chlorpyrifos), peu importe le délai entre l'assimilation et la décontamination, les molécules ne sont pas désorbées par des solutions polysaccharidiques chargées. Ces observations sont résumées dans la Figure IV-14.**

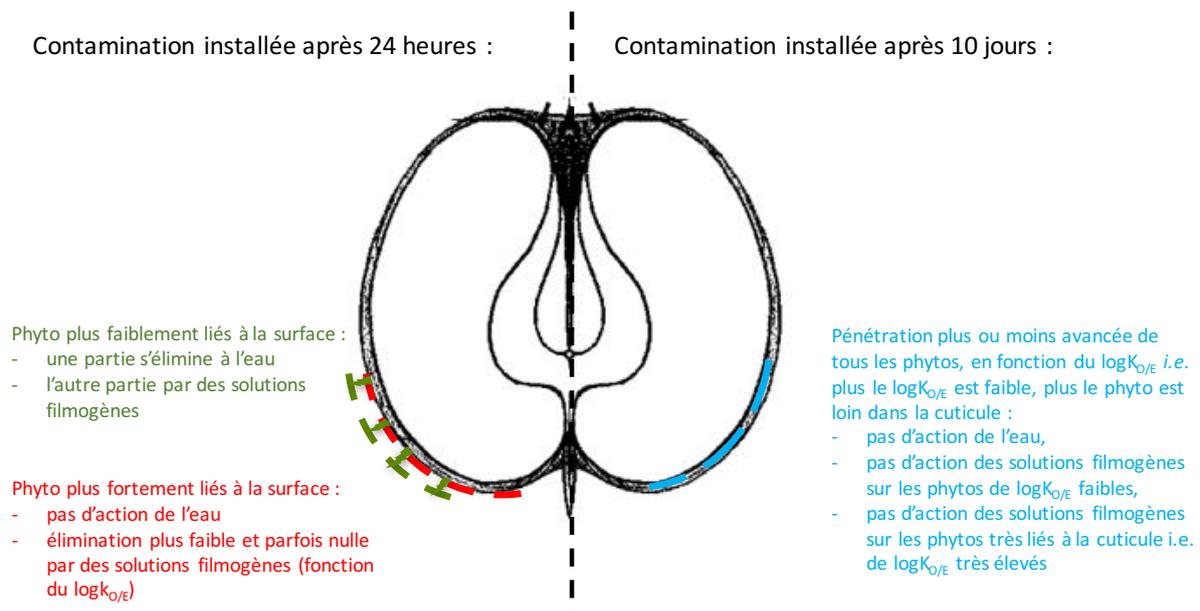


Figure IV-14 : Schématisation du niveau de pénétration des molécules de phytosanitaires dans l'épiderme des pommes au cours du temps et impact sur le procédé de décontamination

A un niveau de pénétration avancée, les résidus ne peuvent plus être éliminés par les traitements à base de polysaccharides acides car leur accès est limité par la barrière lipophile de la cuticule des fruits. Il faut donc trouver un vecteur capable d'acheminer les traitements adsorbants à l'endroit même où se trouvent absorbées les molécules actives. Cette vectorisation doit pouvoir être

réversible car une fois les molécules actives adsorbées, il faudra pouvoir **recupérer tout le complexe vecteur-support-molécules actives en phase aqueuse**.

3. 3. Evaluation des agents de vectorisation

Dans cette dernière phase d'évaluation, des agents aux propriétés tensioactives ont été sélectionnés (Cf. § 2. 5. 1.). Dans la formulation des produits phytosanitaires, les tensioactifs jouent un rôle déterminant (Cf. § 1-3. 3. 3.). Parmi eux, les esters n-alkyliques, les esters dialkyliques de l'acide phtalique, de l'acide adipique et de l'acide subérique, le naphthalène, l'acide octanoïque et l'octanol jouent le rôle d'accélérateurs de mobilité des solutés dans les cires cuticulaires (Reiderer et Schreiber 1995 [10], Schönherr 1993a [12] et 1993b [13], Baur *et al.* 1996 [14], Schreiber 2006 [15]). Ces accélérateurs sont des solvants qui pénètrent dans la cuticule : ils sont dits « actifs » (plastifiants). Les accélérateurs « passifs » sont des solvants (tensioactifs, humectants) qui restent à la surface de la cuticule et qui affectent les partages entre les molécules actives, les adjuvants avec les résidus de formulation et les cires cuticulaires (Bucholz 2006 [16]).

Nous avons procédé à l'évaluation des agents vecteurs lipophiles à partir d'une reconstitution de cires cuticulaires totales de pommes selon une méthode décrite dans la littérature pour la mesure de coefficients de diffusion de solutés en présence ou non d'accélérateurs actifs (Schönherr 1993b [13], Bauer et Schönherr 1992 [17], Schreiber 1995 [18], Schreiber et Schönherr 1993 [19], Casado et Heredia 1999 [20]). Le principe consiste à co-cristalliser sur un support inerte les cires et les molécules de phytosanitaires. L'étape de désorption consiste alors à déposer au-dessus du film et à laisser un certain temps en contact diverses solutions de désorption contenant les agents de vectorisation. Dans la littérature, la lécithine de soja est systématiquement utilisée en tant que support inerte (aucune pénétration dans les cires) pour la désorption des molécules lipophiles (Bauer et Schönherr 1992 [17]). Dans notre étude, les agents ne sont pas co-cristallisés avec les cires et les molécules de phytosanitaires. Ils sont testés comme support de désorption, l'objectif étant d'identifier un agent susceptible de pénétrer dans les cires afin d'augmenter la mobilité des solutés pour faciliter leur extraction et leur sorption dans les vésicules des systèmes organisés (ou les micelles des tensioactifs). Les différentes interactions mises en jeu sont concentration-dépendantes et temps-dépendantes. Dans l'objectif d'identifier un procédé industriel d'extraction des phytosanitaires des pommes, le temps est un paramètre essentiel. Pour cette raison, il a été fixé à 3 heures de contact. Nous avons mis en œuvre diverses expériences dans lesquelles les teneurs en phytosanitaires, en agents vecteurs et en eau varient et avons évalué par CPG/DIF les teneurs en phytosanitaires avant et après désorption dans les cires reconstituées selon le protocole décrit dans le paragraphe 2. 5. 2.

Les cires ont été extraites des épidermes lysés des pommes Fuji (variété 2). Quatre phytosanitaires parmi les 11 de l'étude (Tableau IV-1) ont été sélectionnés de façon à couvrir une large gamme de caractère lipophile mais également parce que ces molécules étaient facilement analysables en CPG : thiaméthoxam ($\log K_{O/E} = -0,13$), boscalid ($\log K_{O/E} = 2,96$), fludioxonil ($\log K_{O/E} = 4,12$) et chlorpyrifos-éthyl ($\log K_{O/E} = 4,70$). La lécithine de soja, phospholipide polaire, a été utilisée comme témoin, conformément à la littérature. Les autres agents vecteurs ont été sélectionnés parmi les composés lipophiles, systèmes organisés (tensioactifs), tous alimentaires. Trois familles ont été proposées dans un premier temps : les monoglycérides à courtes chaînes, les alkylpolyglucosides (APG) et les esters de saccharose et d'acides gras (sucroesters). Les APG ne sont pas utilisés en France comme additifs

alimentaires. Les monoglycérides à longues chaînes et les sucroesters sont inscrits dans le *Codex Alimentarius* sous les codes d'additifs alimentaires E471 et E473, respectivement. Nous avons finalement testé cinq agents de nature lipidique couvrant un large spectre de la balance hydrophile-lipophile (HLB) : un mélange 50/50 de mono- et diglycérides de palmitate et de stéarate E471 (HLB = 3-6), deux sucroesters E473 (un stéarate de HLB = 5 et un palmitate de HLB = 15) qui seront utilisés en mélange (a = 2/3 de 5S + 1/3 de 15P ; b = 1/3 de 5S + 2/3 de 15P), un monooléate de sorbitane polyoxyéthylène ou Tween 80 (E433, HLB = 15) utilisé comme modificateur de la cristallisation des graisses et la lécithine de soja E322 (HLB = 6-9) comme témoin (Leser *et al.* 2006 [21]).

Les résultats des taux d'extraction des résidus dans les cires cuticulaires totales des pommes de la variété 2 par les agents de vectorisation lipophiles figurent dans le tableau de l'annexe 11. Chaque taux d'extraction non nul correspond à une quantité de phytosanitaire en phase liquide dans la solution de désorption. Un taux d'extraction nul correspond à une quantité de phytosanitaire demeuré en phase solide, emprisonné dans les cires recristallisées. Les résultats peuvent donc être représentés sous la forme de diagramme ternaire de phase (Cf. § 2. 5. 2. f-).

3. 3. 1. *Evaluation de l'extraction des phytosanitaires en fonction de leurs caractéristiques*

Expérimentalement, nous avons observé globalement deux comportements des liquides de décontamination à la surface des cires recristallisées (Figure IV-15). Les solutions formulées à partir des additifs E322 et E473 ainsi que l'eau présentent des propriétés plus hydrophiles que la surface des cires et par conséquent leur mouillabilité est faible. En revanche, les solutions à base de E433 et de E471 ainsi que les solvants - éthanol et acétonitrile - possèdent un caractère plus hydrophobe, se rapprochant de celui des cires. La mouillabilité est supérieure. Notons que dans ce cas, plus l'additif est dilué (E433 à 11,1 %), moins la mouillabilité est élevée.

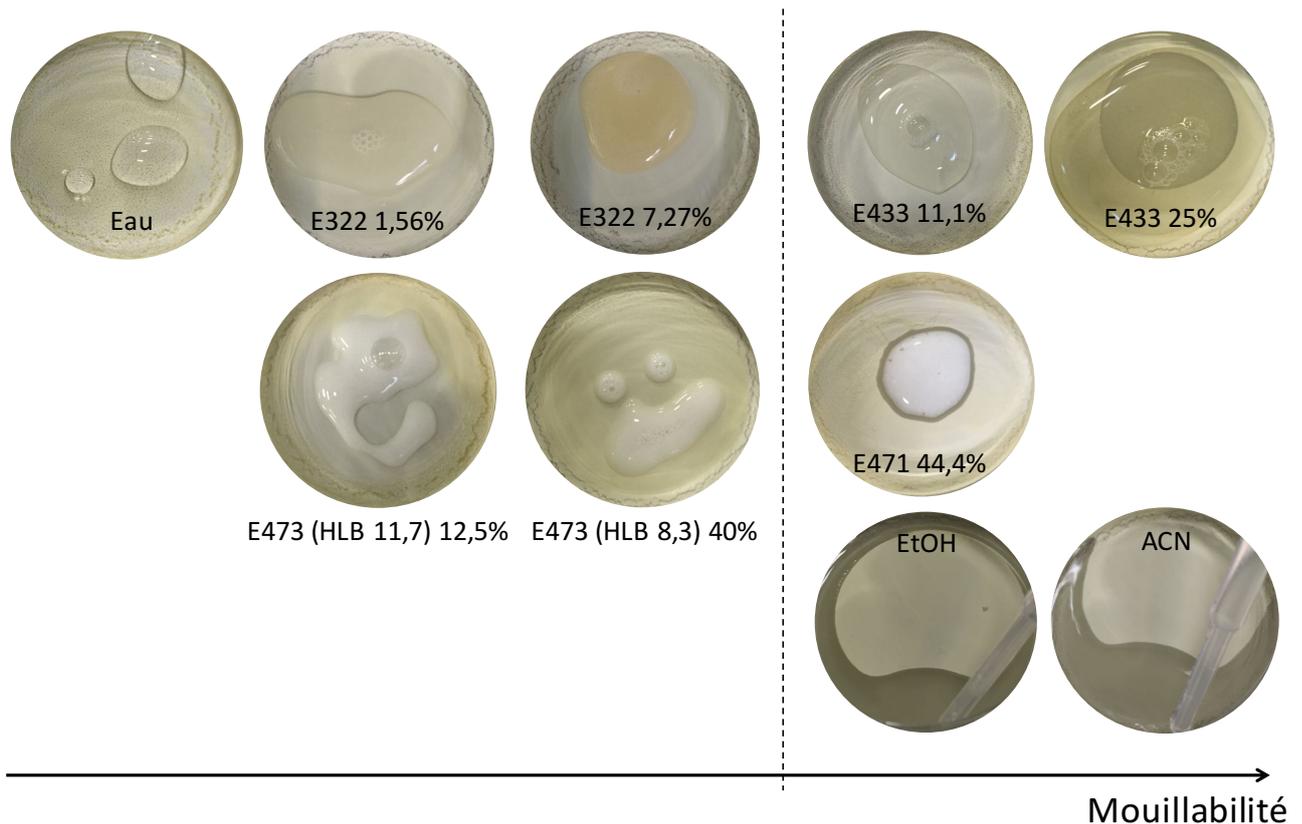


Figure IV-15 : Mise en évidence des différences de mouillabilité des surfaces des cires recristallisées par différents agents

Les résultats des taux d'extraction des résidus dans les cires cuticulaires totales des pommes de la variété 2 par les agents de vectorisation lipophiles figurent dans le tableau de l'annexe 11. Chaque taux d'extraction non nul correspond à une quantité de phytosanitaire en phase liquide dans la solution de désorption, exprimée en milligrammes équivalents de phytosanitaire par kg de cires solubilisés dans la phase liquide. La différence entre le taux initial et le taux d'extraction correspond à la quantité de phytosanitaire demeurée en phase solide, emprisonnée dans les cires recristallisées. Les résultats sont représentés sous la forme de diagrammes ternaires (Cf. § 2. 5. 2. f-) (Figure IV-16).

Le E322 n'est pas un plastifiant des cires et les phytosanitaires ne sont que faiblement extraits. De plus, il n'a pas été possible de préparer des solutions de décontamination à plus de 20 % dans l'eau, ce qui a contribué à limiter le nombre d'expérimentations. Dans le cas du thiaméthoxam, du boscalid et du fludioxonil dont les hydrosolubilités sont respectivement de 4100, 5 et 2 mg/L, notons que l'ajout de lécithine est défavorable à leur extraction d'autant plus que leur concentration initiale dans les cires est faible. Quand la concentration augmente, l'ajout de lécithine favorise l'extraction. Dans le cas du chlorpyrifos, le plus lipophile et le moins hydrosoluble, l'ajout de lécithine améliore son extraction.

L'ajout des sucroesters dans l'eau augmente les taux d'extraction des molécules les moins lipophiles (thiaméthoxam, boscalid, fludioxonil). Les taux d'extraction du chlorpyrifos sont presque nuls. Ce ne sont pas non plus de bons plastifiants. Notons toutefois, que dans le cas du mélange de sucroesters E473 de HLB égale à 11,7 il a été possible d'extraire près de 90 % des 250 mg/kg de thiaméthoxam initialement présents dans les cires. Mais le taux en sucroesters dans l'eau est très élevé (89 %).

Deux agents sont capables d'extraire 100 % des phytosanitaires initialement présents dans les cires : les E471 et E433. Y-a-t-il une relation avec les valeurs HLB des agents ? *A priori*, l'efficacité des extractions ne semblent pas liée aux valeurs des HLB puisque celles-ci sont respectivement de 3,1 et 15. Il semble que l'efficacité soit plutôt liée à la nature des agents et notamment à la longueur des chaînes alkyles qui sont dans ces deux cas de $n = 18$.

Le HLB est lié au $\log K_{O/E}$ des molécules de phytosanitaires : plus le HLB est élevé (E433), plus l'extraction des molécules lipophiles est élevée (chlorpyrifos) ; plus le HLB est bas (E471), plus l'extraction des molécules plus polaires est élevée (thiaméthoxam).

Notons enfin que plus la teneur en phytosanitaires est élevée (50-80 %), plus le taux d'agent E471 ou E433 nécessaire pour extraire la totalité des molécules est faible (entre 10 et 30 %). Plus la teneur en phytosanitaires est faible (10 %), plus il faudra ajouter d'additif E471 ou E433 pour éliminer la totalité des molécules (jusqu'à 70 %). L'hypothèse qu'il peut y avoir une saturation des cires explique que le phytosanitaire soit moins lié aux cires et se solubilise par conséquent plus facilement, même à des teneurs en additif très faibles.

3. 3. 2. Bilan des résultats des essais d'évaluation des additifs alimentaires comme agents vecteurs

Afin d'évaluer les propriétés d'une sélection d'additifs comme plastifiants pour l'extraction de molécules de phytosanitaires dans une matrice complexe, quatre phytosanitaires couvrant une gamme de $\log K_{O/E}$ de -0,13 à +4,70 ont été co-cristallisés avec des cires totales extraites des cuticules des pommes de la variété 2. Cinq additifs ont été testés à diverses concentrations dans l'eau. Les HLB varient de 2 à 15 et les molécules sont d'origine lipidique, essentiellement des esters d'acides gras (C16-C18) et de polyols (glycérol, saccharose, sorbitane) ainsi que des phospholipides : E322, E471, E473, E322. L'efficacité des additifs a été évaluée sur la base de la quantité de phytosanitaires présente dans la solution d'extraction et représentée sous la forme de diagrammes ternaires illustrant la composition de cette solution.

L'interprétation de ces diagrammes a mis en évidence, dans le cas des additifs actifs (E471 et E433), que **(i) moins la teneur en phytosanitaires est élevée, plus la quantité d'additifs dans l'eau pour les désorber doit être importante**. Une teneur plus élevée en phytosanitaire se traduit par une saturation des cires cuticulaires. **Les interactions les plus faibles ne nécessitent que peu d'additif pour la désorption du phytosanitaire concerné ; (ii) plus le phytosanitaire est lipophile ($\log K_{O/E}$ élevé), plus le HLB de l'additif doit être élevé**. Plus le phytosanitaire est lipophile, plus l'affinité avec les cires est grande et la désorption demande des quantités plus élevées en additif. Cela est cohérent avec les travaux de la littérature : au-dessus de la concentration micellaire critique CMC, les micelles de plastifiants (accélérateurs actifs) en formant de nouveaux compartiments de sorption en phase aqueuse entrent en concurrence avec les cires pour la sorption des solutés tandis que les monomères de plastifiants s'adsorbent sur les cires en même temps que les solutés se désorbent (Schreiber 1995 [18]). Les coefficients de partage cires-eau $K_{C/E}$ des solutés diminuent avec l'augmentation de la concentration en accélérateur.

Le choix d'un additif efficace est plus lié à sa nature chimique (esters en C18) qu'à ses propriétés émulsifiantes (HLB). Les additifs E473 sont nettement moins efficaces pour l'extraction des molécules de phytosanitaires. L'additif E322 est contre-productif dans le cas des phytosanitaires les moins lipophiles qui sont en partie hydrosolubles. Néanmoins, il améliore mais faiblement l'extraction des molécules d'hydrosolubilité très faible à nulle (chlorpyrifos).

En conclusion, **l'efficacité des additifs en tant que plastifiants, ou accélérateurs actifs, est dépendante non seulement de leur nature mais aussi de leur concentration, des caractéristiques des solutés (dont le $\log K_{O/E}$) et de l'espèce végétale (interactions phytosanitaires-cires) et de la température (facteur non évalué dans le cadre de cette étude)**. Ces conclusions sont confirmées par les données de la littérature (Schreiber 2006 [15]).

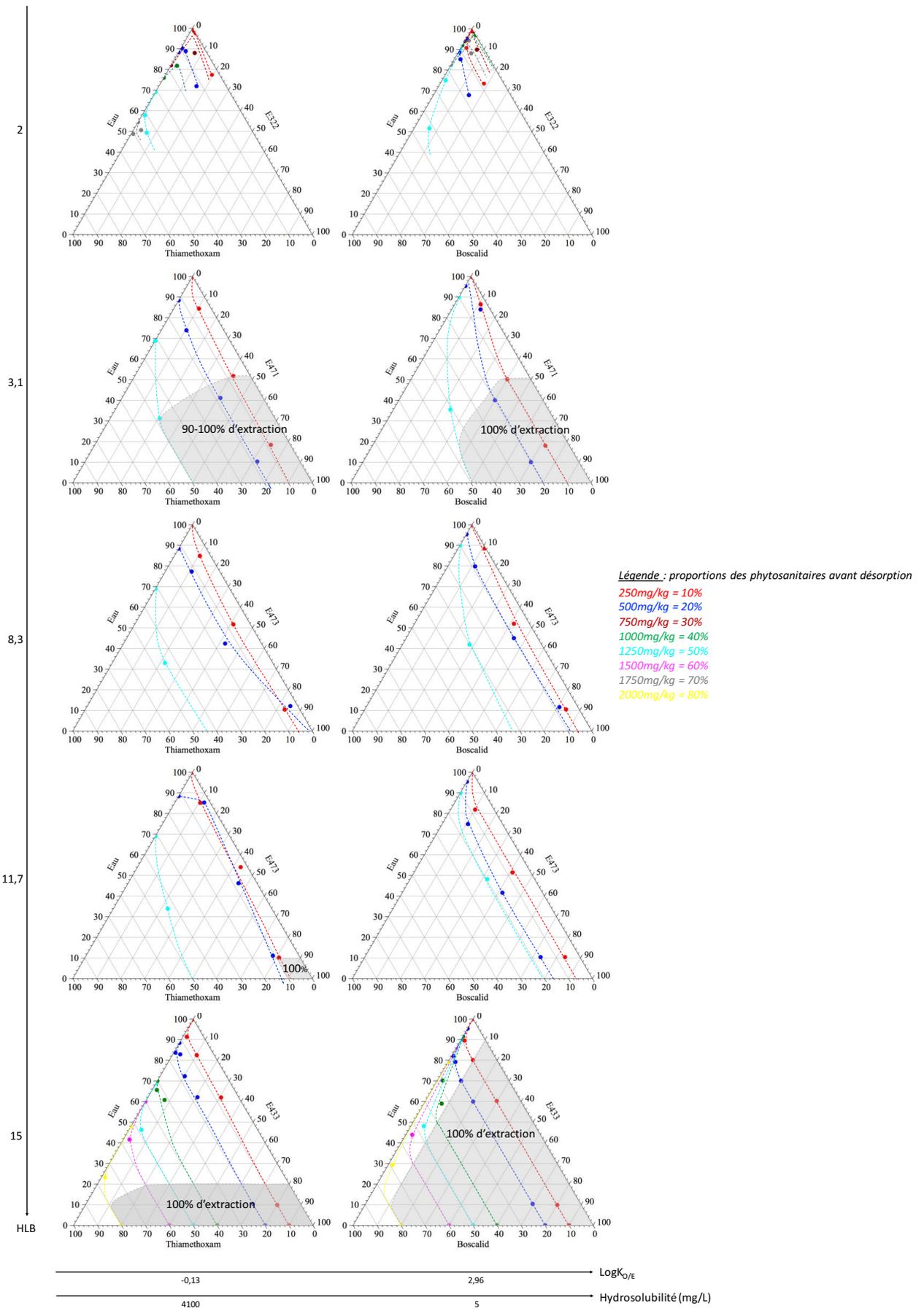


Figure IV-16 : Diagrammes ternaires représentant la composition de la phase liquide d'extraction

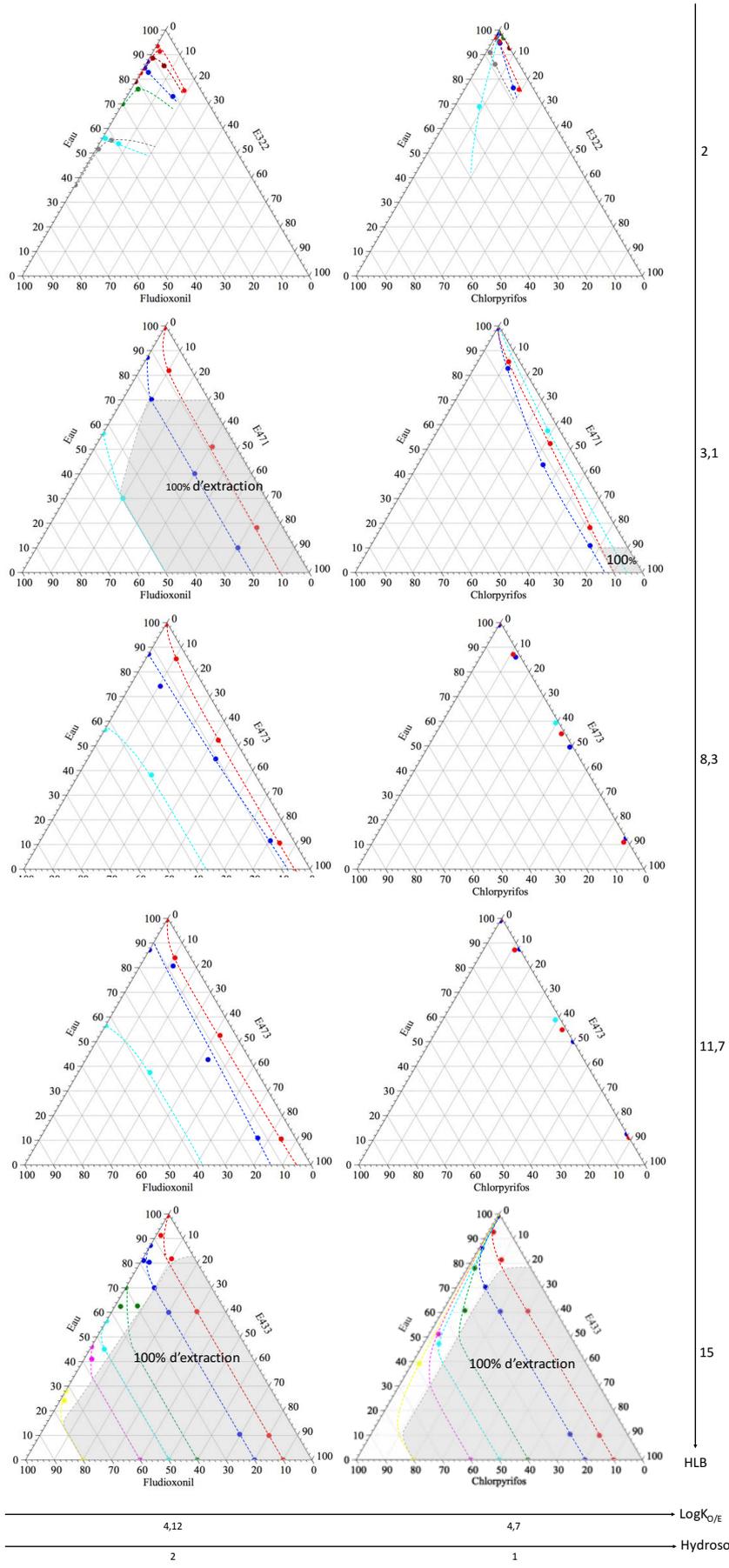


Figure IV-16 : Diagrammes ternaires représentant la composition de la phase liquide d'extraction

3. 4. Résultats des essais de mise au point d'une formule de décontamination des pommes

Les études préliminaires d'évaluation des composés adsorbants des phytosanitaires (Cf. § 3. 1 ; 3. 2. et 3.3) ont mis en évidence que **l'efficacité des traitements sur les pommes était liée au taux de pénétration des molécules** (Figure IV-14). **Le procédé** qui doit être mis au point pour décontaminer les pommes **doit prendre en compte des niveaux de pénétration très avancés dans la cuticule**. Les quantités sont également très faibles (délais plus éloignés depuis le dernier traitement autorisé par phytosanitaire avant la récolte, métabolisation *in situ* Cf. § I- 3. 5.). Dans un milieu très hétérogène mêlant cires, cutine, polysaccharides pariétaux, les résidus seront d'autant plus difficiles à « déloger ». **Les supports adsorbants solides et filmogènes ne présentent pas les propriétés attendues pour pénétrer la cuticule et solubiliser les molécules de phytosanitaires. Les systèmes organisés issus des lipides** présentent un grand intérêt. Ils **peuvent posséder les caractéristiques idéales pour être sorbés puis diffuser à travers une membrane lipophile mais également pour solubiliser des molécules lipophiles telles que les phytosanitaires**. Lors de l'évaluation des agents de vectorisation, certains composés, comme le **Tween 80 (E433) et les esters d'acides gras en C18 et de glycérol (GMS)**, ont extrait jusqu'à 100 % de chlorpyrifos, thiamethoxam, fludixonil et boscalid dans des cires cuticulaires recristallisées de pommes Fuji. En approfondissant ces résultats, nous avons sélectionné une plus large gamme de composés lipidiques alimentaires, et appartenant à la **famille des esters d'acides gras et de glycérol ou de sorbitane** (Tableau IV-15). Lorsque cela a été possible, **différentes longueurs de chaînes ont été étudiées (E491, E492, E493 et E495 / E1518 et MCT)**. Le MCT a été mis en œuvre dans des émulsions eau/huile de grade alimentaire, pour le transport d'hydroxytyrosol. Dans les travaux de 2016 de Chatzidaki *et al.* [22], l'émulsion eau/huile stabilisée par la lécithine E322 et le E476 comme tensio-actifs est utilisée pour encapsuler des molécules bioactives hydrophiles tels que l'hydroxytyrosol. Les émulsions huile/eau sont plus fréquemment utilisées pour le transport de molécules bioactives lipophiles tels que les acides gras ω -3 et les vitamines. Les auteurs ont démontré que l'ajout d'hydroxytyrosol dans les émulsions ne modifiaient pas la rigidité de la membrane mais la mobilité de la molécule est augmentée.

Dans cette partie, nous avons évalué, dans une première approche, la capacité de chacun des composés figurant dans le Tableau IV-15 à extraire les résidus de molécules phytosanitaires dans l'épiderme des trois variétés de pommes. Les composés ont été formulés le plus simplement possible afin de minimiser l'ajout d'additifs (Cf. protocole § 2. 6. 2.). Les liquides plutôt fluides ont été testés purs tandis que les liquides très visqueux (E433, E475 et E476) et les solides ont été dissouts dans l'eau. Nous avons arbitrairement sélectionné une teneur en matière organique de 30 % sur la base des essais précédents avec le Tween 80 (E433). La plupart des composés nécessitant l'ajout de tensioactif pour être émulsionner dans l'eau, des essais de formulation ont conduit aux proportions suivantes : 20 % d'additif alimentaires + 10 % de Tween 80. Dans le cas du E477, l'émulsion n'étant pas suffisamment stable, 5 % d'éthanol ont été ajoutés en co-solvant. Les pommes ont été nettoyées et les résidus quantifiés dans les épidermes par des laboratoires accrédités.

Dans une seconde approche, nous avons mis au point une **méthode de traitement des pommes** (variété 2) qui doit permettre de **s'affranchir de l'inhomogénéité de l'épiderme et par conséquent de l'inhomogénéité de répartition des molécules de phytosanitaires**. Une discussion approfondie des résultats obtenus avec cette méthode d'échantillonnage est proposée, grâce notamment à différents paramètres de solubilité évalués d'après la théorie de Hansen pour les principales molécules mises en jeu à l'interface cuticule – phytosanitaire (Hansen 2000 [1]). Elle s'orientera sur

les caractéristiques fondamentales que doit posséder un plastifiant pour une efficacité d'extraction optimale.

En dernier lieu, nous évaluerons l'efficacité de solvants dont la particularité est de pouvoir diffuser facilement dans des polymères notamment. L'acétone et l'acétonitrile ont été choisis parce qu'ils solubilisent la plupart des molécules de phytosanitaires. Leur action sera comparée à celle du E476, utilisé notamment comme plastifiant dans la formulation de polymères.

3. 4. 1. Essais de vectorisation des résidus phytosanitaires par des plastifiants lipophiles

Les pommes de chaque variété ont été traitées par immersion dans les différents bains. Les résidus ont été quantifiés dans les épidermes par des laboratoires de contrôle accrédités (Cf. protocole § 2. 6. 2.). Ces laboratoires proposent généralement des méthodes de quantification des phytosanitaires les plus couramment utilisés dans le traitement des pommiers et des pommes. Cela représente en moyenne une centaine de molécules. Sur la centaine de molécules qui ont donc été recherchées, seules quelques-unes ont été détectées et quantifiées dans nos échantillons. Les résultats relatifs au boscalid, au captane, au dithianon, au fludioxonil et à la pyraclostrobine, appartenant à la sélection des phytosanitaires de l'étude (Tableau IV-1), figurent dans le Tableau IV-24.

La complexité de la peau du fruit qui a été précédemment étudiée (Voir chapitre II) s'exprime ici de façon flagrante par l'absence de répétabilité de la référence (Variété 1). La nature de la membrane et le mode d'épandage sont autant de facteurs qui limitent la répartition des produits phytosanitaires et par conséquent la régularité de l'assimilation. Il paraît aberrant d'évaluer un taux moyen de résidus tant les résultats sont variables de non détecté à 0,23 mg de fludioxonil par kg. Cette non répétabilité est d'autant plus marquée que le dosage s'effectue dans les peaux, là où les résidus sont les plus concentrés (Mota-Sanchez *et al.* [23], Rasmussen *et al.* 2003 [24]).

La détection du boscalid, captane, dithianon et de la pyraclostrobine est aléatoire et dans le cas de la variété 1 notamment, elles sont détectées entre 1 et 2 fois sur 4 dans la référence. Le fait de ne pas détecter ces molécules ne peut donc pas être interprété comme une preuve d'efficacité. Nous constatons que dans cette série d'essais, le fludioxonil a été détecté dans tous les échantillons de pommes, avec une certaine régularité. Les teneurs sont particulièrement importantes dans les variétés 2 et 3 qui nécessitent de nombreux traitements de conservation. Il a donc servi de traceur pour le reste de l'étude pour évaluer l'efficacité des traitements. Pour la variété 1, la variabilité est beaucoup trop élevée pour pouvoir apprécier l'efficacité des traitements. Seule l'absence de détection peut être interprétée comme une preuve d'efficacité.

L'acétone a permis d'éliminer ou de diminuer très significativement les taux de résidus dans les peaux des trois variétés de pommes. Dans le cas de la variété 2, les solutions à base de E476 et de E492 ont permis de diminuer significativement les résidus de fludioxonil.

Ce qui ressort néanmoins de cette partie de l'étude, c'est la complexité d'interprétation des résultats. La répétabilité est un paramètre qui fait défaut dans le dosage des résidus de phytosanitaires dans ce type de matrice, totalement inhomogène. A cela s'ajoute une certaine inégalité de la répartition des gouttelettes de spray des traitements en verger associée à diverses pertes (séchage inégal des gouttelettes, vaporisation dans l'atmosphère, lessivages, réactions photochimiques...) et les métabolisations des molécules dans le fruit au cours du temps. L'obtention

d'un témoin représentatif semble impossible dans ces conditions. Pour pouvoir comparer la quantité de résidus avant et après décontamination, il faut pouvoir s'affranchir de l'inhomogénéité de répartition des molécules de phytosanitaires dans les épidermes.

Variété	Code essai	Durée (min)	Résidus (mg/kg de peaux)				
			Boscalid	Captane	Dithianon	Fludioxonil	Pyraclostrobine
1	Réf		0,039	0,012	Nd	0,031	0,053
			0,076	0,021	0,086	0,031	0,052
			Nd	Nd	Nd	0,23	Nd
			Nd	Nd	Nd	0,028	Nd
	MCT	15	0,027	Nd	Nd	Nd	0,036
	E414		0,13	0,021	0,091	0,038	0,063
	E433		0,061	Nd	Nd	0,049	0,06
	E475		0,04	Nd	0,026	0,093	0,037
	E476		0,048	Nd	Nd	0,18	0,027
	E477		0,063	Nd	0,01	0,019	0,067
	E491		0,05	Nd	Nd	0,049	0,045
	E492		0,14	Nd	0,046	0,019	0,15
			Nd	Nd	0,022	0,15	Nd
			Nd	Nd	Nd	0,014	Nd
	Duo	180	Nd	Nd	Nd	0,25	Nd
	Duo+		Nd	Nd	Nd	0,14	Nd
	Duo US		Nd	Nd	Nd	0,11	Nd
Duo+ US	Nd		Nd	Nd	0,11	Nd	
Acétone	Nd		Nd	Nd	Nd	Nd	
	Nd		Nd	Nd	Nd	Nd	
2	Réf		Nd	Nd	0,21	0,19	Nd
	MCT	15	0,054	Nd	Nd	0,14	Nd
	E414		Nd	Nd	0,23	0,13	Nd
	E433		Nd	Nd	0,17	0,1	Nd
	E475		Nd	Nd	0,035	0,13	Nd
	E476		Nd	Nd	Nd	0,092	Nd
	E477		Nd	Nd	0,022	0,12	Nd
	E491		Nd	Nd	0,15	0,1	Nd
	E492		Nd	Nd	0,2	0,085	Nd
	Duo	180	Nd	Nd	Nd	0,12	Nd
	Duo+		Nd	Nd	Nd	0,14	Nd
	Duo US		Nd	Nd	Nd	0,13	Nd
	Duo+ US		Nd	Nd	0,057	0,12	Nd
	Acétone		Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Nd			Nd	Nd	Nd	Nd	
3	Réf		Nd	Nd	Nd	0,39	Nd
	MCT	15	Nd	Nd	Nd	0,48	0,024
	E414		Nd	Nd	Nd	0,78	0,034
	E433		Nd	Nd	0,045	0,49	Nd
	E475		Nd	Nd	0,015	0,4	0,014
	E476		Nd	Nd	Nd	0,46	0,022
	E477		Nd	Nd	Nd	0,56	0,015
	E491		Nd	Nd	Nd	0,24	Nd
	E492		Nd	Nd	Nd	0,65	0,029
	Acétone		Nd	Nd	Nd	0,017	Nd
Nd			Nd	Nd	0,017	Nd	

Tableau IV-24 : Teneurs en phytosanitaires évaluées dans les épidermes de pommes après décontamination en batch de 15 minutes (Variétés 1,2 et 3)

Légende : Nd non détecté (< 0,005 mg/kg)

3. 4. 2. Evaluation du comportement des plastifiants dans les épidermes des pommes au moyen d'un protocole analytique spécifique. Interprétation des résultats selon la théorie de Hansen

Un protocole expérimental a été développé pour permettre de résoudre le problème de la répartition inégale des résidus dans les épidermes de pommes. Il consiste à sélectionner un échantillon de pommes (variété 2) et à peler la moitié de chaque individu. Les pommes sont ensuite traitées et les moitiés d'épidermes restantes sont échantillonnées à leur tour. Les résidus de fludioxonil dans les moitiés d'épidermes servant de référence, notées $\frac{1}{2}$ Réf, et dans les moitiés d'épidermes traités, notées $\frac{1}{2}$ MCT, $\frac{1}{2}$ E475..., sont analysés. Ce protocole a permis d'une part de calculer un taux résiduel moyen assez répétable de fludioxonil d'une valeur de 0,25 mg / kg d'épiderme avec une RSD de 21 %. D'autre part, un taux d'extraction du fludioxonil pour chaque traitement a pu être évalué d'autre part, par rapport à chaque moitié de pomme ayant servi de référence et par rapport au taux moyen de fludioxonil pouvant être initialement présent. En moyenne, les taux d'extraction sont au moins de 40 % (Annexe 12).

Afin d'interpréter les différents résultats et d'évaluer l'efficacité des agents utilisés dans cette étude, nous avons proposé le schéma de la Figure IV-17, d'après les données de la littérature (Cf. § I- 2. 2. + Figure 1-21, § I- 2. 5. 2. + Figure 1-37 et § I- 3. 2. + Figure 1-44) et notre étude par RMN du ^{19}F en milieu solide de la dynamique du fludioxonil dans la cuticule des épidermes de pommes Fuji (Cf. § II 3. 5.). Nous avons identifié deux étapes dans l'extraction du fludioxonil par les agents. La première étape consiste en la pénétration du plastifiant (Figure IV-17, A) pour laquelle interviennent plusieurs paramètres : la masse moléculaire (MM) et le volume molaire (VM) qui sont liés à la sélectivité de taille de la cuticule, et les coefficients de partage du plastifiant entre la phase aqueuse et les différents composés de la cuticule (cires et cutine, $K_{C/E}$ et $K_{MC/E}$ respectivement). Dans la deuxième étape (Figure IV-17, B), la solubilisation du fludioxonil dans le plastifiant fait intervenir les coefficients de partage du fludioxonil entre le plastifiant d'une part et les composés de la cuticule (cires et cutine) d'autre part ($K_{P/C}$ et $K_{P/MC}$). La phase d'élimination du plastifiant avec le fludioxonil dissout n'a pas été représentée dans la Figure IV-17.

A- Sorption et diffusion du plastifiant dans la cuticule :

B- Solubilisation du fludioxonil dans le plastifiant :

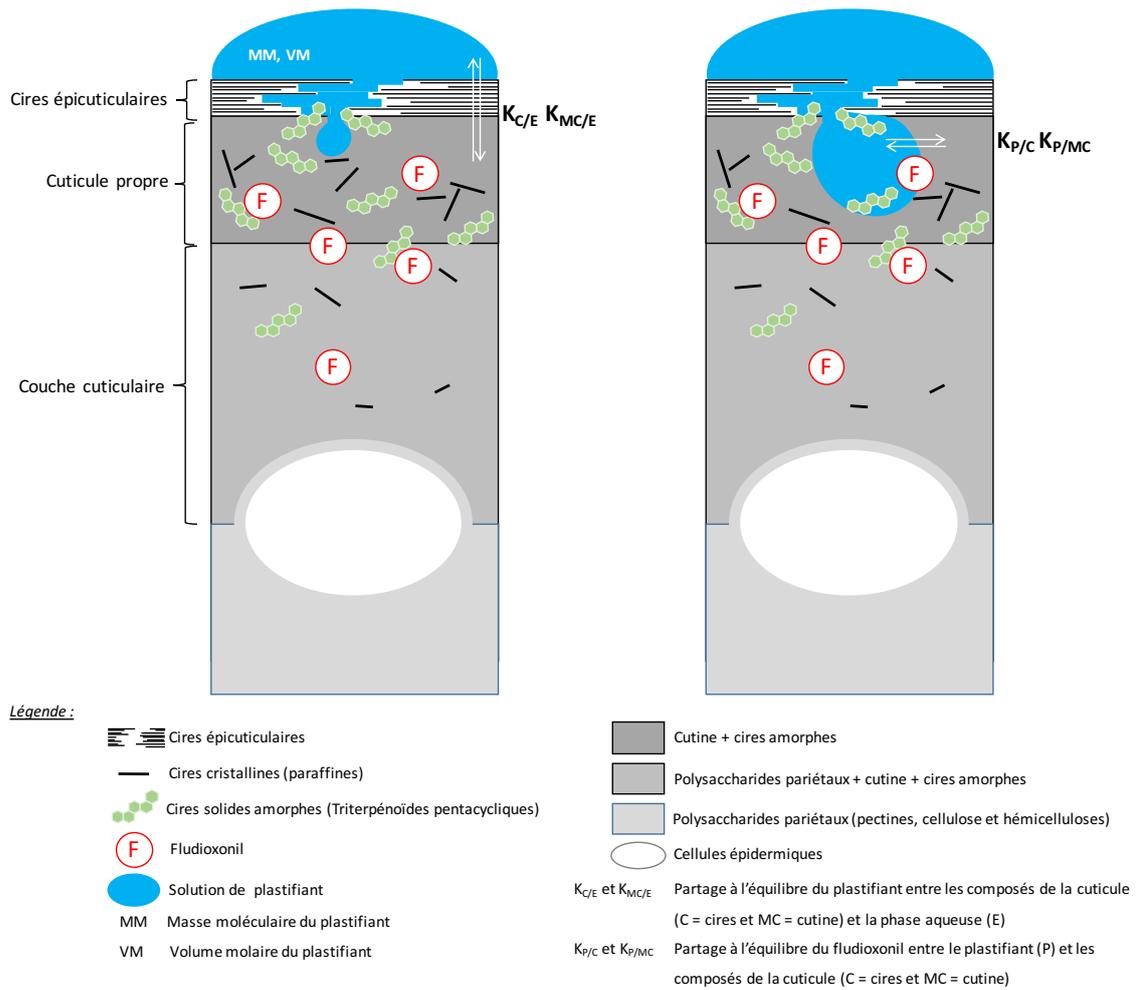


Figure IV-17 : Schéma d'action des plastifiants pour l'extraction du fludioxonil dans les cuticules de pommes

Nous avons attribué $K_{C/E}$ à l'affinité que pourrait avoir le plastifiant pour les cires de la cuticule. $K_{MC/E}$ a été identifié à $K_{O/E}$ d'après Schreiber en 2006 [15]. Les coefficients $K_{P/C}$ et $K_{P/MC}$ sont liés à la différence d'affinité qui existe entre le fludioxonil et la cuticule d'une part et entre le fludioxonil et le plastifiant d'autre part. Dans la théorie de Hansen, l'affinité entre deux molécules peut être représentée par la distance qui séparent leurs paramètres de solubilité δ_D , δ_P et δ_H , définissant un espace à trois dimensions dans lequel s'organisent les molécules (Hansen 2000 [1]). Cette distance notée R_a est définie par l'équation (1) :

$$Ra^2 = 4(\delta_{D1} - \delta_{D2})^2 + (\delta_{P1} - \delta_{P2})^2 + (\delta_{H1} - \delta_{H2})^2 \quad (1)$$

Dans cette équation, notons que le facteur 4 a été ajouté afin de pouvoir représenter les données de solubilités d'une substance sous la forme d'une sphère dans l'espace 3D de Hansen. Ce facteur rééquilibre le paramètre δ_D dont la variabilité entre deux molécules est moindre par rapport aux deux autres. Les comportements entre plusieurs composés peuvent être prédits grâce aux paramètres de solubilité et aux distances R_a . En effet, selon Hansen, « like dissolves like » (deux substances proches se solubilisent) et « like meets like » (deux substances proches se rencontrent).

Nous avons donc évalué les paramètres de solubilité (HSP) pour les cires totales extraites des cuticules des pommes Fuji (variété 2), de l'acide oléanolique, du chlorpyrifos et du thiamethoxam (pour les pesticides lipophiles et hydrophiles respectivement) ainsi que ceux des plastifiants (E414, E433, E475, E476, E477, E491, E492, E493, E495, E1518 et acétone). Les HSP peuvent être également calculés selon la théorie de contribution des groupes (Hansen 2000 [1]). Ils ont été calculés pour les autres phytosanitaires (boscalid, captane, carbendazime, dithianon, flonicamid, fludioxonil, propargite, thiaclopride, pirimicarbe et pyraclostrobine). Pour les solvants (eau, acétone, éthanol, acétonitrile, acétate d'éthyle), ils sont connus dans la littérature. Lorsque les HSP sont évalués expérimentalement (Cf. protocole § 2. 7.), un rayon de solubilité R_0 est calculé qui représente le rayon de la sphère de solubilité du composé qui constitue le centre. Par extension, le R_0 du chlorpyrifos sera utilisé comme rayon des sphères des phytosanitaires lipophiles tandis que celui du thiamethoxam sera repris comme rayon des sphères de solubilité des phytosanitaires hydrophiles ($\log K_{O/E} < 0$). Les résultats figurent dans le tableau de l'annexe 13 et les sphères de solubilité sont représentées dans la Figure IV-18.

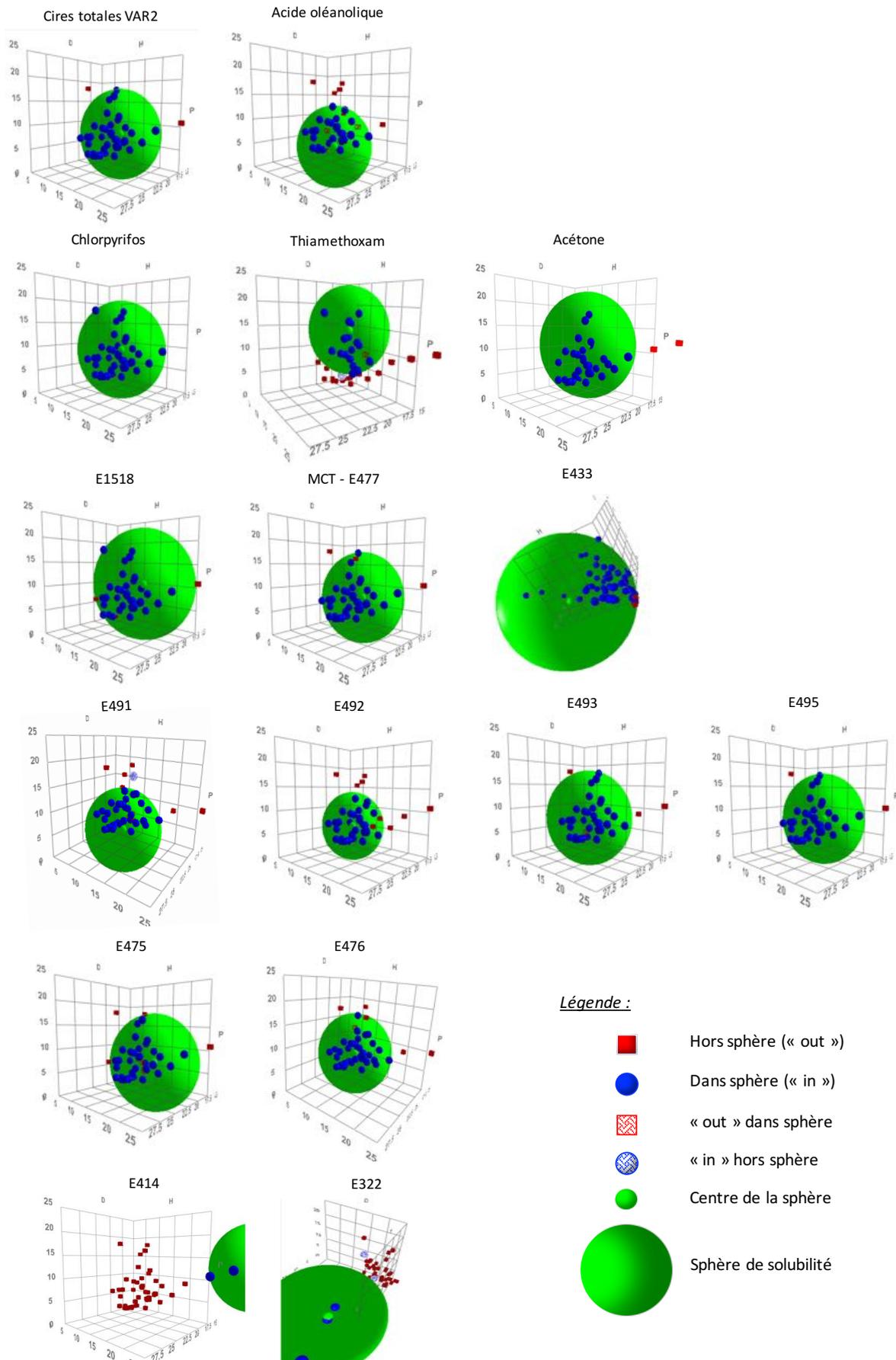


Figure IV-18 : Sphères de solubilité selon Hansen

A partir des HSP, plusieurs nombres représentant la différence d'énergie relative entre deux composés appelée RED ont été calculés ($RED = Ra/R0$). Ils représentent la position d'un composé dans la sphère de solubilité d'un autre composé. Il faudra noter que le facteur 4 présent dans l'équation (1) a dû être éliminé lors du calcul des RED. En effet, s'il n'influence pas les valeurs concernant des molécules non halogénées, dans le cas des molécules halogénées telles que le fludioxonil, les plastifiants ne sont plus discriminés par les valeurs RED M/flu. Dans le cas des molécules halogénées, le paramètre δD ne revêt que peu d'importance par rapport au paramètre δP représentant les forces de Keesom entre deux dipôles permanents (Durand 2010 [25]). Les résultats de l'étude pour l'évaluation de l'efficacité des plastifiants sur demie pomme sont présentés dans le Tableau IV-25.

Molécule M	Efficacité traitement	Facteurs limitant la diffusion dans la cuticule : sélectivité de taille, affinité M-cuticule					Facteurs limitant la solubilisation du flu dans M : affinités M-flu et flu-cuticule		
	mg Flu / kg épiderme	MM (g/mol)	VM (mL/mol)	Ra M-cires	RED M/cires	$\log K_{O/E}$	RED M/flu	RED flu/cires	RED flu/cutine
Fludioxonil flu	-	248,2	1094,4	5,22	0,46	4,12	0,00	0,46	< 0,46
H2O	0,250	18,0	18	35,13	3,08	-	2,86		
MCT	0,088	507,8	534,5	0,57	0,05	C8 8,25 ¹ C10 10,92 ¹	0,46		
E475	0,130	880,0	946,2	1,96	0,17	5,0 ± 1,0 ²	0,53		
E476	0,165	2800,0	> 2800,0	3,49	0,31	13,3 ± 3,8 ²	0,50		
E477	0,096	392,6	426,7	0,57	0,05	3,59 ¹	0,46		
E491	0,104	430,6	430,7	5,49	0,48	5,24 ¹	0,68		
E492	0,111	963,5	1036,1	4,84	0,42	20,86 ¹	0,6		
E493	0,142	346,5	346,5	3,49	0,31	2,57 ¹	0,45		
E495	0,116	402,6	403	0,17	0,02	4,35 ¹	0,42		
E1518	0,146	218,2	188,2	3,62	0,32	0,21	0,42		
Acétone	0,046	58,1	73,8	3,76	0,33	- 0,24	0,37		

Tableau IV-25 : Evaluation de l'efficacité des plastifiants en fonction de différents paramètres physico-chimiques dont les HSP

Légende : MM masse moléculaire, VM volume molaire, ¹chemicalize.org, ²vcclab.org

Les cellules surlignées en vert représentent les valeurs vers lesquelles les différents paramètres doivent tendre pour abaisser significativement les teneurs en fludioxonil des épidermes (Variété 2). **Pour que l'étape de pénétration du plastifiant (Figure IV-17, A) soit optimale, il faut que le volume molaire soit le plus faible possible (acétone) et que l'affinité du plastifiant avec les cires ou avec la cutine soit maximale.** En effet, plus le RED M/cires sera petit (MCT, E477 et E495) et/ou plus le $\log K_{O/E}$ sera grand (E492), plus l'affinité pour les cires et/ou la cutine respectivement sera importante. De plus, pour une durée de contact donnée, à une température donnée, **plus le Ra entre le plastifiant et les cires sera faible, plus la diffusion D sera importante.** Les Ra les plus faibles ont été calculés pour le MCT, le E477 et le E495.

Dans la seconde étape d'action (Figure IV-17, B), le plastifiant doit solubiliser le fludioxonil. Pour cela, la solubilité du fludioxonil doit être plus élevée dans le plastifiant que dans les différents composés de la cuticule. Selon la théorie de Hansen, plus le nombre RED tend vers 0, plus le composé est proche de celui au centre de la sphère (affinité plus importante). Si le RED est supérieur

à 1, l'affinité est nulle. **Plus le RED M/flu sera inférieur aux RED flu/cires et/ou flu/cutine, plus le plastifiant entraînera le fludioxonil et affaiblira les liaisons entre le fludioxonil et la cuticule.** Les HSP de la cutine n'ont pas été évalués et ne peuvent pas être calculés (polymère complexe). Les résultats de l'étude de la dynamique du fludioxonil (Cf. § II- 3. 5.) dans la cuticule ont montré que le fludioxonil se distribue dans les cires dans deux environnements de mobilité différente : un très mobile (minoritaire) et un autre de mobilité plus limitée (majoritaire). **Des liaisons hydrogène avec les acides triterpéniques des cires pourraient immobiliser une partie du fludioxonil. Dans les cires, il a été démontré que le fludioxonil était peu lié puisqu'il était totalement éliminé par un rinçage à l'eau et à l'éthanol.** Si l'on se réfère au paramètre δH , qui correspond au potentiel de liaison hydrogène, le δH de l'acide oléanolique est égal à 8,67 (Annexe 13). L'éthanol est solvant du fludioxonil et son δH est égal à 19,4. Si le δH du solvant est plus élevé que celui de l'acide oléanolique et que le solvant solubilise le fludioxonil, il est donc possible que l'extraction soit facile et rapide. En revanche, l'étude a montré que **l'affinité du fludioxonil avec la cutine était beaucoup plus marquée puisque le fludioxonil n'est pas totalement éliminé au rinçage.** Dans la cutine, le fludioxonil existe dans un environnement dans lequel il est très mobile. Il a été supposé qu'il pouvait s'agir de différentes configurations : zones solvatées, zones très mobiles ou pores du polymère. Les chaînes du polymère de cutine étant particulièrement longue (C16-C18) bien qu'hydroxylées, **les interactions seront plus de nature hydrophobe. Dans la cuticule entière, cires et cutine s'interconnectent et la répartition du fludioxonil est moyennée de la façon suivante : un environnement mobile (majoritaire) et un moins mobile (minoritaire). La solvatation du fludioxonil par le plastifiant doit affaiblir l'ensemble des liaisons mises en jeu dans le processus de rétention dans la cuticule.**

Nous avons donc supposé que le RED flu/cutine devait être inférieur à celui calculé pour les cires. Seul le RED acétone/flu est inférieur au RED flu/cires tandis que les RED E491 et E492/cires sont les plus élevés, à l'exception de l'eau (Tableau IV-25). **Si l'on considère que dans les cires, l'interaction avec l'acide oléanolique est prépondérante,** tous les RED M/flu, sauf celui de l'eau, sont inférieurs au RED flu/acide oléanolique égal à 0,74. Dans ce cas, **l'utilisation du nombre RED tend à minimiser le rôle du paramètre δH , prépondérant dans les liaisons hydrogène.** Seuls le E475 et le E1518 possèdent un δH supérieur à celui de l'acide oléanolique (Annexe 13). **Concernant l'interaction majoritaire du fludioxonil avec la cutine dans la cuticule, nous pourrions supposer qu'il faudra au contraire des plastifiants avec des paramètres δP et δH les plus faibles possibles (augmenter le caractère hydrophobe) et que δP soit le plus proche de celui du fludioxonil égal à 10 (acétone et E1518).**

Il est évident que tous ces phénomènes coexistent à un temps donné et que pour optimiser l'extraction du fludioxonil, il faut tenir compte de tous les paramètres suscités. **La donnée de la durée du traitement est fondamentale pour que les équilibres puissent s'installer au sein de la matrice.** Enfin, la concentration en plastifiant est également une valeur significative.

En conclusion, au vu des résultats d'extraction du fludioxonil (Annexe 12), l'acétone (- 82 %), le MCT (- 65 %), le E477 (- 62 %), le E491 (- 58 %), le E492 (- 56 %) et le E495 (- 54 %) sont les meilleurs plastifiants. **Il est difficile de déterminer lequel ou lesquels des paramètres sont significatifs quant à l'efficacité du traitement** tant les propriétés des plastifiants sont variées : l'acétone a le plus petit volume molaire et un δH identique à celui du fludioxonil, le MCT a le Ra et le RED avec les cires le plus petit et une affinité pour la cutine grande, le E492 a l'affinité la plus forte avec la cutine avec un $\log K_{O/E}$ le plus grand... **Tous les paramètres jouent un rôle qui semble équivalent et complémentaire.**

Comment varie l'extraction en fonction de la nature du phytosanitaire ? Pour répondre à cette question, nous avons évalué la capacité d'extraction de la triacétine E1518 selon le même protocole sur les phytosanitaires sélectionnés (Cf. Tableau IV-1) dans l'étude et détectés pour les variétés 2 et 3 (Tableau IV-26). Dans cette expérience, cinq résidus ont été quantifiés par un laboratoire accrédité.

Variété	Code essai	Résidus (mg/kg de peaux) % extraction				
		Boscalid	Captane	Dithianon	Fludioxonil	Pyraclostrobine
2	½ E1518	0,01 57 %	0,027 94 %	0,039 65 %	0,38 42 %	Nd -
	½ Réf	0,023	0,42	0,11	0,65	Nd
3	½ E1518	0,063 43 %	Nd 100 %	0,023 39 %	Nd 100 %	0,038 36 %
	½ Réf	0,11	0,022	0,038	0,011	0,059
VM (mL/mol)		900,9	665,4	179,6	1094,4	976,7
RED phyto/cires		0,65	0,55	0,52	0,46	0,61
RED E1518/phyto		0,61	0,70	0,50	0,42	0,49

Tableau IV-26 : Taux d'extraction des phytosanitaires dans les épidermes de pommes (Variétés 2 et 3) par la triacétine E1518
Légende : Nd = non détecté

VM = volume molaire

Les RED E1518/phytosanitaires sont tous inférieurs à 1 donc la triacétine solubilise théoriquement tous les résidus. Sauf pour le captane, tous les RED E1518/phytosanitaires sont inférieurs aux RED phytosanitaires/cires. La solubilisation des phytosanitaires dans le E1518 est favorisée. Concernant les taux d'extraction évalués pour le captane, il faut savoir que la molécule, qui est analysée par CPG/SM/SM, se dégrade dans l'injecteur dès 200°C. Les mesures peuvent être la plupart du temps sous-estimées tant sur la référence que sur la pomme décontaminée.

Les taux d'extraction varient d'un résidu à l'autre. Pour la variété 2, le taux d'extraction du fludioxonil est le plus faible, toujours de 42 %, comme pour les précédents essais. Les autres résidus peuvent être classés par ordre croissant d'extraction : boscalid < dithianon < captane.

En observant les volumes molaires (VM) des phytosanitaires, ceux-ci peuvent être classés par ordre décroissant de leur VM : fludioxonil > pyraclostrobine > boscalid > captane >> dithianon. C'est exactement le sens inverse du taux d'extraction de chaque résidu. **Plus le volume molaire du phytosanitaire est petit, meilleure est sa diffusion dans le solvant.**

Dans le cas de la variété 3, en admettant qu'elle soit modélisable avec les paramètres physico-chimiques de la variété 2, les observations se confirment. Le résultat du fludioxonil ne peut pas être pris en compte car le résidu dans la moitié référence est déjà à la limite de quantification (LQ = 0,01 mg/kg). Le taux d'extraction du dithianon est pourtant inférieur au taux prévisible. Ce résultat peut provenir d'une erreur de quantification dans la référence ou même dans la partie après traitement. En effet, c'est une molécule instable dont le recouvrement est variable. Des pertes peuvent survenir au moment de l'extraction, une hydrolyse au cours de la préparation de l'extrait... (Steeman 2014 [26]).

En conclusion, pour éliminer un résidu phytosanitaire dans la cuticule des pommes, il faut :

- optimiser la diffusion du plastifiant dans le milieu en minimisant son volume molaire et en maximisant sa compatibilité avec les cires et la cutine (Ra distance entre le plastifiant et les cires la plus faible, RED plastifiant/cires le plus proche de 0 et $\log K_{O/E}$ le plus élevé),
- optimiser l'action du plastifiant en affaiblissant les interactions phytosanitaires-cires et phytosanitaires-cuticule au profit des interactions phytosanitaires/plastifiant (RED plastifiant/phytosanitaires < RED phytosanitaires/cires et RED phytosanitaires/cuticules, en particulier δP et δH petits et δP proche de celui des phytosanitaires halogénés),
- éliminer le plastifiant pour éliminer les phytosanitaires en interaction avec lui.

Plus le volume molaire du phytosanitaire sera faible, meilleur sera le taux d'extraction car sa diffusion dans le plastifiant sera plus facile. Plus la durée de contact du traitement augmente et meilleure sera l'efficacité. La concentration en plastifiant doit être suffisante pour pénétrer la cuticule et solvater les molécules de phytosanitaires.

3. 4. 3. Evaluation du comportement dans l'épiderme de deux solvants

Les solvants font partie des molécules aux propriétés plastifiantes en cela qu'il s'agit de molécules aux volumes molaires faibles et qui diffusent assez facilement dans les milieux, notamment les polymères. Nous avons estimé le pouvoir plastifiant de deux solvants (acétone et acétonitrile) et l'avons comparé à celui du E476, utilisé comme plastifiant dans la fabrication de polymères (Tableau IV-15). Pour cela, des pommes Fuji ont été immergées dans des solvants et dans la formulation à base de E476. Les durées d'immersion ont été diminuées de 15 à 4 minutes et le brossage éliminé. Les résidus ont été quantifiés dans le fruit entier et non plus dans la peau.

Code essai	Durée contact (min)	Résidus (mg/kg de poids frais)				
		Boscalid	Captane	Dithianon	Fludioxonil	Pyraclostrobine
Référence	4	Nd	Nd	0,055	0,035	Nd
Acétone	4	Nd	Nd	Nd	< LQ	Nd
Acétonitrile	4	Nd	Nd	< LQ	0,018	Nd
E476	4	Nd	Nd	0,019	0,046	Nd

Tableau IV-27 : Résidus phytosanitaires dans les pommes après décontamination en batch de 4 minutes sans brossage (Variété 2)

Légende : Nd = non détecté (< 0,005 mg/kg)

LQ = limite de détection (< 0,01 mg/kg)

Les résultats dans les fruits confirment les conclusions du paragraphe précédent. Le dithianon de volume molaire plus petit est mieux extrait que le fludioxonil. L'acétonitrile présente la compatibilité avec les cires la plus faible : RED acétonitrile/cires VAR2 = 1,2 (0,3 pour l'acétone et le E476). De plus, il solubilise moins bien le fludioxonil (RED acétonitrile/fludioxonil = 0,77) et le dithianon (RED acétonitrile/dithianon = 0,89) que l'acétone (respectivement 0,37 et 0,49 respectivement). L'acétonitrile est donc moins efficace que l'acétone. Quant au E476, même si les RED E476/fludioxonil et E476/dithianon sont plus petits que ceux de l'acétonitrile, son volume molaire très grand limite sa diffusion dans l'épiderme et diminue l'efficacité d'extraction. C'est la moins efficace des trois solutions.

3. 5. Etude de la dynamique moléculaire du fludioxonil dans la membrane cuticulaire de la pomme (variété 2) en présence de plastifiants par RMN ^{19}F du solide

L'étude précédente a mis en évidence que le plastifiant devait pénétrer la cuticule pour pouvoir agir au niveau des molécules de phytosanitaires. Mais que se passe-t-il concrètement dans la cuticule au niveau intermoléculaire entre les molécules de plastifiants et celles des phytosanitaires ? Le plastifiant agit-il sur la viscosité des cires pour augmenter la mobilité du phytosanitaire ? Pour répondre à ces questions, nous avons fait appel à la RMN du ^{19}F en milieu solide pour évaluer l'effet de chaque plastifiant sur les données dynamiques du fludioxonil dans les cuticules isolées par voie enzymatique des pommes Fuji (Cf. protocole § 2. 8. 1.) ainsi qu'à la RMN du ^{13}C en milieu solide (CP-MAS, DP-MAS et INERT-MAS cf. § 2. 8. 3.) pour étudier l'effet plastifiant sur la structure des cuticules. Pour conclure, un bilan relatif aux interactions plastifiant-phytosanitaire dans la cuticule sera proposé et discuté.

3. 5 .1. Etude de l'effet des plastifiants sur la mobilité du fludioxonil dans les cuticules de pommes de la variété 2

La dynamique du fludioxonil dans les cuticules de pommes isolées de la variété 2 en présence de plastifiants a été évaluée par RMN ^{19}F du solide. Plusieurs grandeurs ont été mesurées à partir des spectres : l'intensité du signal par rapport à la masse d'échantillon introduite dans la sonde qui permet de calculer un taux d'élimination du fludioxonil par rapport à des références, ainsi que le déplacement chimique du signal du fluor et la largeur de raie qui permettent d'évaluer l'interaction du fluor avec son environnement moléculaire (Tableau IV-28).

Echantillon	Intensité du signal F / masse d'échantillon en mg	% extraction / référence	Déplacement chimique δ (ppm)	Largeur de raie $\Delta\nu_{1/2}$ (Hz)
Réf ¹	0,1344 ± 0,0015 (n = 3)	-	- 49,65 ± 0,04 (n = 3)	570 ± 174 (n = 3)
Témoin ²	0,0394 (n = 2)	71	- 49,67 (n = 2)	710 (n = 2)
Réf + E433	np	-	- 49,76	40
Réf + E433 AR	0,0177*	87	- 49,79	50
Réf + E475	np	-	- 49,84	55
Réf + E475 AR	0,0216	84	- 49,83	110
Réf + E476	np	-	- 49,89	100
Réf + E476 AR	0,0391*	71	- 49,91	100
Réf + E477	np	-	- 49,93 - 50,33	460 50
Réf + E477 AR	0,0180	87	- 49,62	650
Réf + E491	np	-	- 49,88	70
Réf + E491 AR	0,0277	79	- 49,82	750
Réf + E492	np	-	- 49,94	140
Réf + E492 AR	0,0070	95	- 49,76	580
Réf + E493	np	-	- 48,78	440
Réf + E493 AR	0,0416	69	- 49,71	520
Réf + E495	np	-	- 48,68	480
Réf + E495 AR	0,0292	78	- 49,70	460
Réf + E1518	np	-	- 49,93 - 50,43	700 110
Réf + E1518 AR	0,0200	85	- 49,64	480
Réf + MCT	np	-	- 49,75 - 50,33	300 50
Réf + MCT AR	0,0104	92	- 50,02	460

Tableau IV-28 : Grandeurs dynamiques du fludioxonil sorbé à 0,14 % dans les cuticules entières obtenues après lyse enzymatique d'épidermes de pommes (Variété 2), avant et après extraction par des plastifiants et rinçage

Légende : ¹ Réf = référence = cuticules entières + 0,14 % fludioxonil sorbé

² cuticules entières + 0,14 % fludioxonil sorbé après rinçage

AR = après rinçage

np = non pertinent car la masse d'échantillon est majorée par une quantité importante et inconnue de plastifiant non éliminé par l'étape de rinçage

* reste de plastifiant malgré le rinçage

L'ajout de plastifiants modifie l'environnement chimique du fludioxonil : une variation de déplacement chimique du signal ¹⁹F de la molécule est toujours observée par rapport à celui de la référence (cuticules entières + 0,14 % fludioxonil) ou du témoin (cuticules entières + 0,14 % de fludioxonil rincés par eau et éthanol) indiquant l'effet de solvatation du plastifiant. Il faut noter que la variation des déplacements chimiques dépend de l'agencement du plastifiant autour du fludioxonil mais également de la nature des groupements chimiques impliqués dans l'interaction fludioxonil-plastifiant. En général, après élimination des plastifiants par rinçage eau + éthanol, les déplacements des signaux de fluor tendent à revenir à la position initiale de - 49,65 ppm. Cependant, l'eau et l'éthanol mis en œuvre dans l'étape de rinçage ne parviennent pas à solubiliser tous les plastifiants et dans le cas des E433, E475 et E476 pour lesquels des résidus sont significativement présents dans les échantillons après rinçage, le déplacement chimique reste identique à celui avant rinçage.

La modification des déplacements chimiques s'accompagne systématiquement par une modification de la largeur des raies. En présence de plastifiant, soit le spectre présente une raie fine avec $\Delta\nu_{1/2}$ compris entre 40 et 140 Hz (Figure IV-19, d), soit la raie est plus large autour de 450 Hz (E493 et

E495) (Figure IV-19, c). L'affinement des raies provient d'une augmentation, plus ou moins importante, de la mobilité locale du fludioxonil suite à l'effet de solvation des plastifiants. Dans le cas des plastifiants E477, E1518 et MCT, les spectres sont différents. Ils présentent deux raies : une large ($\Delta\nu_{1/2} > 300$ Hz) et une fine avec $\Delta\nu_{1/2}$ variant de 50 à 110 Hz (Figure IV-19, b).

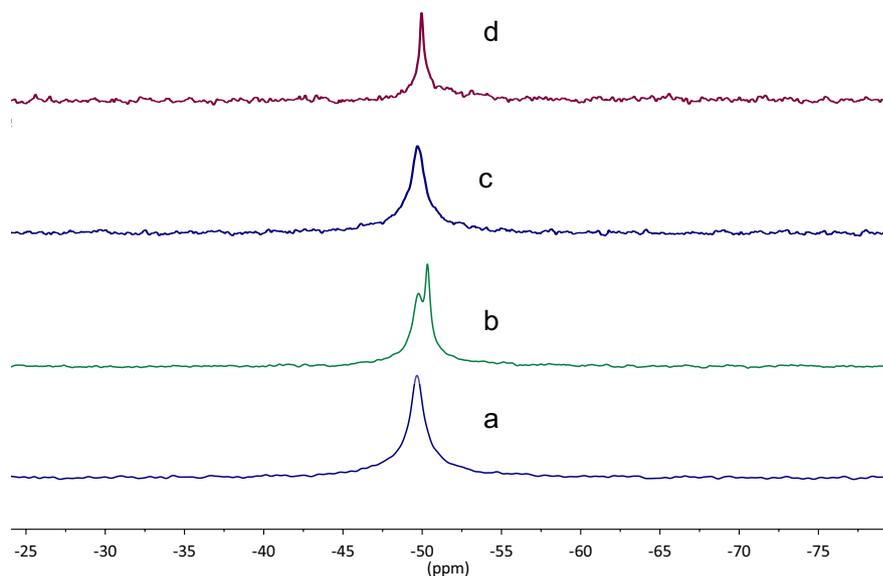


Figure IV-19 : Spectres de RMN ^{19}F de (a) cuticules de pommes (Variété 2) + 0,14 % fludioxonil, en présence de (b) MCT, (c) E495) et (d) E492)

Les deux raies observées sur les spectres dans le cas des plastifiants E477, E1518 et MCT suggèrent qu'ils interagissent avec le fludioxonil de deux façons différentes : une interaction très forte qui se traduit par une variation de δ importante couplée à une raie très fine (solvation importante) et une autre plus faible (variation de δ plus faible et raie plus large). Les autres plastifiants ne présentent qu'une seule raie avec des variations de δ plus faibles que celles de l'interaction forte pour E477, E1518 et MCT. Les raies peuvent être fines ($\Delta\nu_{1/2} < 200$ Hz), ce qui indique cependant une interaction relativement importante avec le plastifiant, ou larges ($\Delta\nu_{1/2} > 300$ Hz) pour une interaction faible.

Une interprétation possible de ces résultats peut s'appuyer sur la cinétique de pénétration du plastifiant dans la cuticule. Cette phase de pénétration, comme dans le cas des phytosanitaires, suppose une étape de diffusion précédée d'une étape de sorption. Pour un temps donné de réaction, il faut évaluer la quantité de plastifiant qui pénètre dans la cuticule, la vitesse à laquelle il diffuse, sa faculté à solvater les molécules de fludioxonil au détriment des interactions avec les composés de la cuticule. Les équilibres plastifiant-cuticule et plastifiant-fludioxonil ne sont pas atteints de façon équivalente pour tous les plastifiants. De plus, lors de la phase de rinçage, il faut que le plastifiant puisse être correctement éliminé pour que tout le fludioxonil qu'il aura dissout puisse être éliminé.

Comme il a été discuté précédemment (Cf. § 3. 4. 2.), la capacité d'action du plastifiant dans la cuticule peut être assimilée à plusieurs paramètres tels que le Ra et le RED plastifiant/cires, le $\log K_{O/E}$, les volumes molaires et le RED plastifiant/fludioxonil (Figure IV-20).

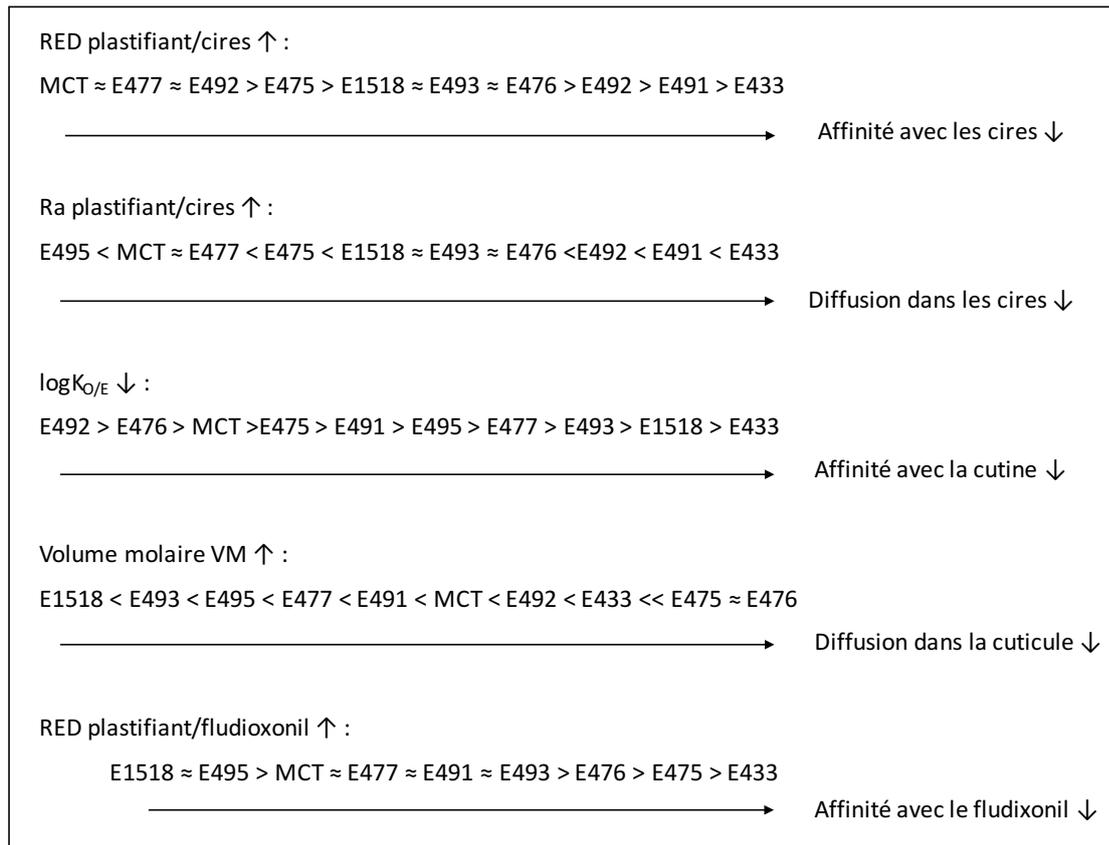


Figure IV-20 : Impact des caractéristiques des plastifiants sur leur efficacité

Les plastifiants de volume molaire faible (E1518) et/ou avec une affinité pour les cires élevée (E477 et MCT) mais une affinité pour la cutine variable (logK_{O/E} variant de 0,2 à 10,9 Tableau IV-25) vont se déplacer plus ou moins vite. Mais ils vont aussi atteindre probablement des zones de la cuticule dans lesquelles le fludioxonil est en interaction plus forte avec la matrice, probablement à proximité des cires (Cf. § II- 3. 5.) et, par conséquent où sa solvatisation est plus limitée, cela pourrait expliquer la présence d'une seconde raie large dans les spectres des cuticules traitées par MCT, E477 et E1518.

Les plastifiants de volume molaire plus important, dont l'affinité avec la cuticule est plus limitée (pénétration plus faible) vont se déplacer moins vite et moins facilement et en quantité restreinte. La solvatisation du fludioxonil est limitée : une seule raie plus ou moins large est observée sur les spectres du ¹⁹F. Dans le cas du E492, dont l'affinité pour la cutine, dans laquelle se trouve le fludioxonil majoritaire le plus mobile (Cf. § II- 3. 5.), est la plus élevée (logK_{O/E} = 20,9), l'efficacité d'extraction est la plus élevée de toutes pour un temps de réaction de 15 minutes. Le E492 interagit rapidement avec le fludioxonil dans la cutine mais ne doit pas interagir avec celui proche des cires (acides triterpéniques) moins mobile. **Les résidus les plus accessibles et les moins en interaction avec la matrice sont certainement extraits les premiers.**

Afin d'évaluer l'impact du temps sur la pénétration et l'action des plastifiants, une expérience complémentaire a été menée sur une durée de contact de 24 heures pour le E1518 et le E491. Aucun signal de fluor n'a été détecté sur le spectre d'un échantillon de cuticules + 0,14 % fludioxonil + E1518. Par contre, pour l'échantillon de cuticules + 0,14 % fludioxonil + E491, il reste encore 7,5 % de fludioxonil contre 21 % pour 15 minutes de réaction. En conclusion, **plus la durée d'extraction augmente, plus le plastifiant pourra atteindre le fludioxonil le plus inaccessible.**

En résumé, l'étude de l'interaction du fludioxonil avec une sélection de plastifiants a permis de les classer en trois catégories :

- **ceux qui présentent une certaine affinité avec la cutine et qui par leurs propriétés physico-chimiques sont capables d'atteindre et de solvater le fludioxonil le moins accessible, probablement celui en forte interaction avec les cires et qui est minoritaire. Ils solvant assez rapidement le fludioxonil de la cutine et un peu moins rapidement celui moins mobile.**
- **ceux qui présentent une grande affinité avec la cutine dans laquelle se situe la majorité du fludioxonil qui y est très mobile. Ils vont agir rapidement sur celui-ci mais n'agissent pas sur le fludioxonil minoritaire moins accessible.**
- **ceux qui présentent une affinité moins grande avec la cutine. Ils agiront moins rapidement que les précédents sur le fludioxonil majoritaire et n'agiront pas non plus sur le minoritaire.**

Quand le temps de réaction augmente, la pénétration des plastifiants dans la cuticule augmente, les interactions plastifiant/cuticule, plastifiant/phytosanitaire et phytosanitaire/cuticule tendent vers l'équilibre : les taux d'extraction sont améliorés.

3. 5. 2. Etude de l'effet plastifiant sur la structure de la cuticule par RMN ^{13}C du solide

L'état de l'art révèle que les plastifiants diminuent la viscosité des cires amorphes et/ou la tortuosité du trajet de diffusion du soluté mais ne solubilisent pas les cires cristallines car leur action est réversible. Ils diminuent le paramètre β de sélectivité de taille de la phase amorphe des cires mais ne modifient pas D_0 (coefficient de diffusion d'un soluté hypothétique de volume molaire nul) relié à la phase cristalline (Cf. § I- 3. 2.) (Schreiber 2006 [15]). Ces effets peuvent être étudiés par RMN du ^{13}C car, selon de nombreux auteurs, le plastifiant peut induire une modification du ratio des résonances RMN du ^{13}C à 29 et 32 ppm des chaînes aliphatiques. Par exemple, Chen et Xing en 2005 [27] ont démontré par RMN que la sorption d'hydrocarbures aromatiques polycycliques dans des cires cuticulaires reconstituées de grains de poivre vert entraînait la transition d'une phase solide amorphe vers des phases mobiles amorphes. Cette conclusion est issue de l'observation d'une augmentation du signal à 29 ppm après sorption dans l'expérience ^{13}C CP-MAS.

Dans notre étude, les cuticules entières, décirées et les cires des épidermes de pommes Fuji (variété 2) en présence de triacétine (E1518) ont été analysées par RMN ^{13}C du solide par CP-MAS et DP-MAS (Figure IV-21). Les signaux à 29 et 32 ppm ont été comparés entre les deux analyses. Dans la cuticule décirée, la présence de triacétine ne semblent pas modifier l'environnement des molécules de matrice (pas de modification significatives des δ et $\Delta\nu_{1/2}$ des résonances ^{13}C). En revanche, dans les cires, pour une intensité du signal à 29 ppm constante, le signal à 32 ppm diminue en présence de triacétine dans l'expérience CP-MAS. La triacétine solvate en partie les cires en interagissant avec les zones cristallines (caractérisées par le signal à 32 ppm). L'analyse par DP-MAS montre qu'une partie du signal à 32 ppm est transformée en signal à 29 ppm. Ces résultats indiquent qu'une partie des zones cristallines rigides est convertie en zones amorphes plus mobiles en présence de triacétine.

Après rinçage des échantillons, la triacétine est éliminée et les signaux reprennent leur intensité initiale.

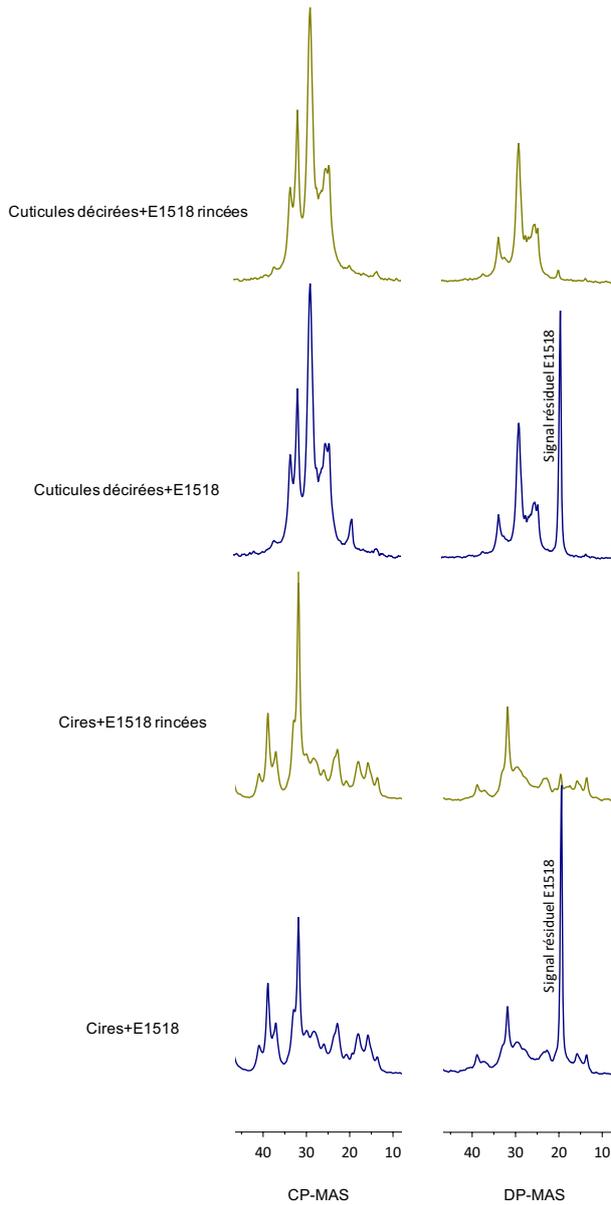


Figure IV-21 : Spectres de RMN du ¹³C CP-MAS et DP-MAS des cires et des cuticules décirées des épidermes de pommes (variété 2) avec et sans triacétine (E1518)

3. 5. 3. Bilan

La pénétration du fludioxonil dans la cuticule est inhomogène parce que la matrice elle-même est inhomogène. Notre étude antérieure sur la localisation de la molécule de fludioxonil dans la matrice cuticulaire (Cf. § II- 3. 5.) a mis en évidence que la molécule se trouvait dans deux environnements distincts, (i) l'un dans lequel elle est majoritaire et très mobile, la cutine, et (ii) l'autre dans lequel elle est minoritaire et sa mobilité est limitée en raison d'interactions importantes avec cires. L'évaluation par RMN du ¹⁹F de l'interaction du fludioxonil dans la cuticule avec les plastifiants étudiés a permis de classer ces derniers en deux catégories :

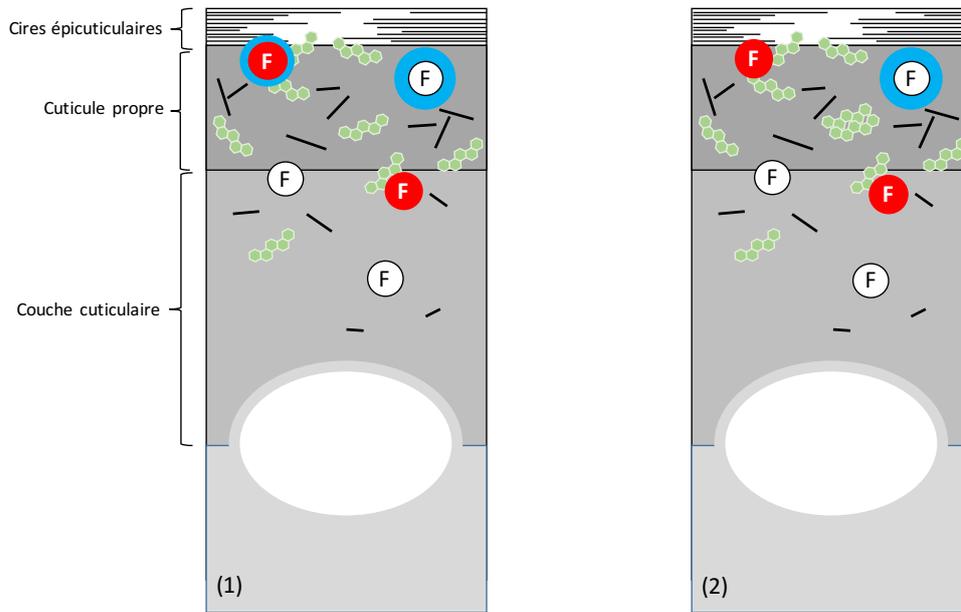
- ceux qui agissent plus ou moins rapidement sur le fludioxonil très mobile majoritaire situé dans la cutine et qui interagissent également mais plus lentement sur le fludioxonil minoritaire moins accessible car plus lié à la matrice (Figure IV-22, A(1)),

- **ceux qui agissent plus ou moins rapidement mais uniquement sur le fludioxonil majoritaire (Figure IV-22, A(2)).**

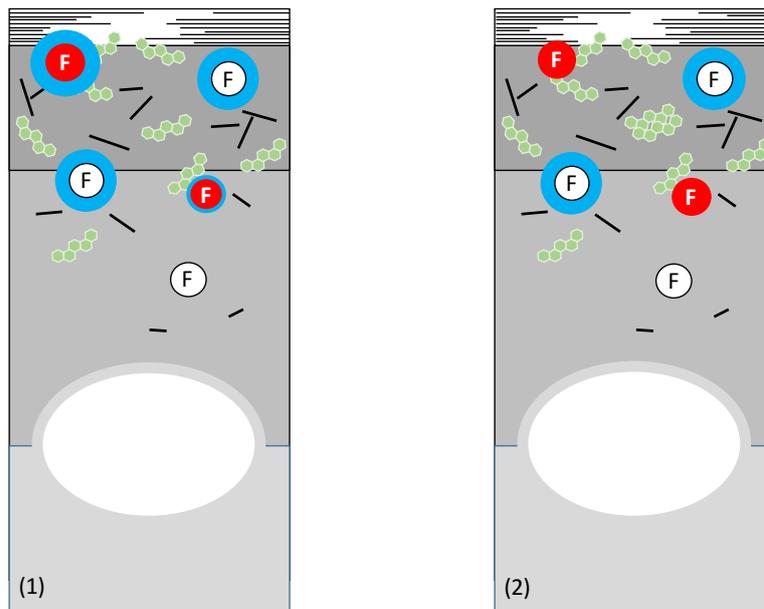
Les cinétiques d'interaction plastifiants-cuticule et fludioxonil-plastifiants sont temps dépendantes. Pour optimiser l'extraction du fludioxonil, il faudra augmenter les temps de réaction. Dans ces conditions, les plastifiants de la première catégorie seront susceptibles d'extraire tout le fludioxonil dans la cuticule (Figure IV-22, B(1)) tandis que ceux de la seconde catégorie n'agiront pas sur le fludioxonil minoritaire (Figure IV-22, B(2)). Pour ces raisons, le MCT, le E477 et le E1518 peuvent être considérés comme des plastifiants efficaces, les autres seront moyennement efficaces.

L'ajout de plastifiant dans les cuticules ne modifie pas la conformation des molécules de cutine mais agit en partie sur la mobilité des cires en interagissant avec les structures cristallines. Les plastifiants augmentent significativement les coefficients de diffusion D des solutés ainsi que leur propre coefficient à travers les membranes lorsque leur mobilité est inférieure ou égale à celle des solutés (Schreiber 1995 [18]). En terme de mobilité, les volumes molaires de tous les plastifiants étudiés à l'exception du E476 sont inférieurs à celui du fludioxonil (Tableau IV-25). Ils sont donc susceptibles d'augmenter la mobilité du fludioxonil dans la cuticule.

A- Pour une durée de contact donnée, la diffusion du plastifiant dans la cuticule est limitée par ses caractéristiques physico-chimiques et les interactions avec la cuticule :



B- Quand la durée de contact augmente, le plastifiant diffuse plus profondément dans la cuticule et les quantités de fluidoxonil solvate augmentent :



Légende :

-  Cires épicuticulaires
-  Cires cristallines (paraffines)
-  Cires solides amorphes (Triterpénoïdes pentacycliques)
-  Fluidoxonil très mobile dans la cutine (majoritaire)
-  Fluidoxonil peu mobile, liée aux cires (minoritaire)
-  Sphère de solvatation du fluidoxonil par le plastifiant
-  Cutine + cires amorphes
-  Polysaccharides pariétaux + cutine + cires amorphes
-  Polysaccharides pariétaux (pectines, cellulose et hémicelluloses)
-  Cellules épidermiques

Figure IV-22 : Schéma théorique des interactions plastifiant/fluidoxonil dans la cuticule, en fonction des propriétés des plastifiants et du temps.

Légende : (1) Additifs tels que MCT, E477, E1518,
(2) Additifs tels que E491, E492, E493, E495...

3. 6. Résultats des essais de faisabilité d'un procédé de décontamination sur pilote laboratoire Certains supports filmogènes (Pectines Citrus notées PC) et vecteurs (Tween 80 noté T) dont les propriétés extractives supérieures ont été mises en évidence lors des évaluations préliminaires ont été étudiés sur un pilote laboratoire, conçu et réalisé par MAF Roda, afin d'appréhender les verrous technologiques liés aux différents modules communément utilisés en station fruitière (Cf. § 2. 9.). Pour ces essais, les pommes ont été contaminées dans des solutions aqueuses de Bellis, Pyrinex, Geoxe et Actara. Les histogrammes de la Figure IV-23 représentent les taux d'extraction moyens obtenus pour quatre résidus, boscalid, chlorpyrifos-Et, fludioxonil et thiamethoxam. Les teneurs résiduelles ont été évaluées dans la peau des fruits par CPG/SM et figurent en annexe 14.

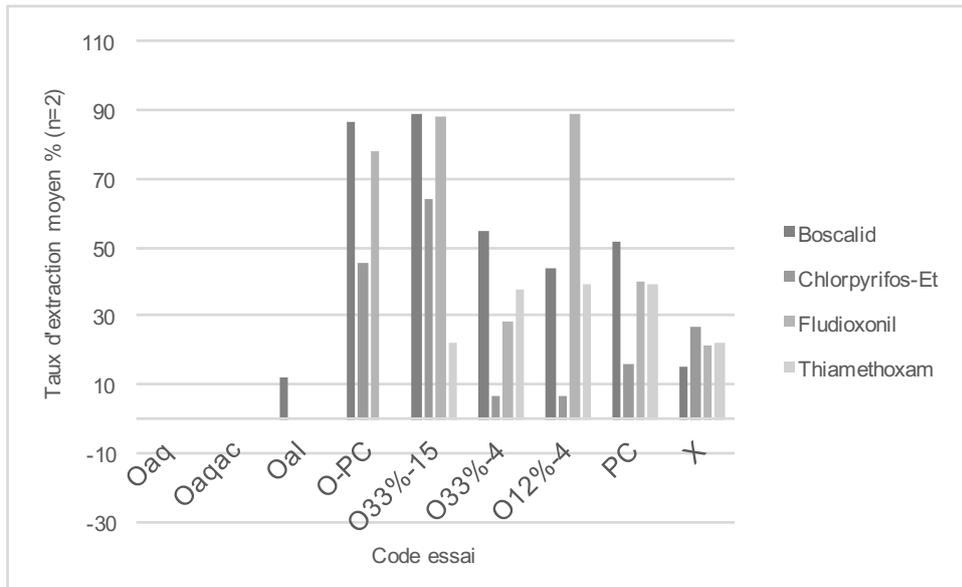


Figure IV-23 : Taux d'extraction des essais de faisabilité d'un procédé de décontamination sur pilote laboratoire

Les essais codés Taq, Taqac et Tal ont été réalisés 24 heures après la contamination des pommes. Le procédé mis en œuvre correspond à une utilisation en ligne du pilote. La durée moyenne de convoyage est de l'ordre de 5 minutes entre le moment où les fruits sont déposés sur les bicônes et où ils sont récupérés après décontamination – séchage – rinçage. Les taux d'extraction se sont avérés nuls contrairement aux résultats obtenus lors des évaluations préliminaires. La mise en contact des produits de traitement n'est pas suffisante. Le pilote ne comprend qu'un seul spray dans la zone de sprayage et le jet n'est pas continu (pompe à clapets). Les pommes ne sont pas uniformément mouillées et le temps de séjour est très court. En résumé, il n'y a pas suffisamment de produit et la durée de contact est faible : les traitements ne peuvent pas agir.

Les autres essais ont été réalisés 8 jours après la contamination des pommes. Le procédé mis en œuvre comporte des ruptures de process par rapport au pilote laboratoire. La zone de vaporisation ne permet pas de vaporiser des produits épais tels que les pectines et les résultats après 24 heures ont montré que les produits ne pouvaient pas agir dans ces conditions. La vaporisation a été remplacée par une immersion dont la durée varie de 4 à 15 minutes. La phase de séchage n'a été utilisée que pour solidifier le film de pectines (PC). La phase de rinçage sur le pilote a été utilisée pour tous les essais sauf pour X. L'essai X a été ajouté parce qu'il a été observé une recontamination des pommes en station fruitière après le passage dans la cireuse. La cire étant formulée dans l'éthanol, l'essai a pour but d'évaluer le pouvoir solvant de l'éthanol vis-à-vis des résidus. Après 24 heures de séchage à l'air libre, le film est redissout dans l'éthanol et les résidus sont évalués dans la solution.

Les taux d'extraction pour X sont une estimation par rapport aux teneurs résiduelles dans les peaux. Les taux d'extraction de X sont les plus faibles < 30 %. Le séchage complet du dispositif peut être préjudiciable aux phénomènes d'échanges au sein de la matrice. Il est avéré que la phase de sorption du phytosanitaire ne peut avoir lieu qu'en milieu liquide (Riederer et Schreiber [10], Baur *et al.* [14], Schreiber et Schönherr 1993 [19], Bucholz *et al.* [28]). Il est vraisemblable que la phase de désorption puisse nécessiter les mêmes conditions. Pour les autres essais, les taux d'extraction sont compris entre 5 et 90 %. Plus le temps de contact est grand, meilleurs sont les taux d'extraction. Globalement, le chlorpyrifos est le résidu le moins bien extrait, conformément aux conclusions des évaluations préliminaires. A l'exception de quatre pics d'extraction concernant le boscalid et le fludioxonil, la moyenne d'extraction peut être estimée autour de 50 %. Elle était autour de 0 % pour le boscalid et de 40 % pour la pyraclostrobine (gommes et pectines, contact 15 minutes) lors des évaluations (Figure IV-13). Le Tween 80, pour lequel des taux d'extraction de 100 % dans les cires totales VAR2 ont été mesurés lors des évaluations de vecteurs lipophiles, permet d'augmenter les taux d'extraction du boscalid de 0 à plus de 50 %.

En conclusion, indépendamment de la nature des produits de traitement, le mode d'application du produit et le transport des pommes qui sont directement liés à la durée de mise en contact sont cruciaux pour le développement d'un procédé de décontamination optimal (viscosité, pompes, buses, convoiage...).

Ces essais sur pilote laboratoire ont permis d'appréhender les différents verrous technologiques pour la mise en place d'une chaîne à échelle préindustrielle.

4. Essais de décontamination sur pilote préindustriel en station fruitière

Dans cette dernière phase du développement d'un procédé de décontamination des pommes pour l'obtention d'un « zéro résidu » détectable, une série d'essais a été mise en œuvre sur un pilote en conditions industrielles réelles.

Dans un premier temps, le pilote, construit et installé par MAF Roda, est décrit par rapport au cahier des charges fourni par le LCA. La sélection des plastifiants et des solvants ainsi que de la variété de pommes avec laquelle seront effectués tous les essais est ensuite présentée, étayée par les résultats antérieurs des évaluations d'agents désorbants et des essais en laboratoire.

Dans un second temps, les résultats des essais réalisés sont présentés et les teneurs résiduelles en phytosanitaires dans les pommes après décontamination sont discutées en fonction des variables préalablement identifiées.

Pour conclure, une discussion sur un schéma probable d'action des plastifiants et des solvants dans la cuticule, éclairée par les résultats des différents essais, est proposée.

Le procédé ayant conduit au « zéro résidu » détectable est décrit par un schéma global, tenant compte des différentes propriétés ou paramètres à mettre en œuvre pour extraire avec une efficacité maximale les molécules de phytosanitaires au cœur de la cuticule des pommes.

4. 1. Présentation du pilote

Le pilote préindustriel qui a été mis en œuvre pour les essais décrits ci-après a été conçu par l'équipementier de stations fruitières MAF Roda.

Selon un cahier des charges établi au fur et à mesure des essais de décontamination à l'échelle laboratoire et de la mise en évidence des différentes interactions qui interviennent entre les molécules au sein de la cuticule, le pilote doit comporter des modules bien identifiés : (i) des modules pour une immersion des pommes, (ii) des modules de jets – éventuellement sous haute pression - qui permettraient de vaporiser des produits différents et complémentaires à ceux des bains d'immersion, (iii) des brosses pour l'action mécanique et enfin (iv) la possibilité de chauffer les bains de traitement jusqu'à 15°C. Le broyage est une étape d'action mécanique au cours de laquelle la mouillabilité de certaines variétés de pommes peut augmenter (Cf. § II- 3. 3. 2. 1. f- et II- 3. 4. 4.). En effet, les cires épicuticulaires sous la forme de cristaux perpendiculaires à la surface de l'épiderme s'arrachent sous l'effet de l'abrasion et la surface devient plus hydrophile (l'angle de goutte diminue). Dans le cas des cires plutôt horizontales, elles peuvent être amenées à glisser les unes sur les autres, et la pénétration des solutés devrait en être améliorée. La possibilité de pouvoir utiliser de l'eau chaude en phase de rinçage a également été proposée, en raison de la nature lipidique de certains produits de traitement mais également parce que la température a, en théorie, un effet plastifiant sur les cires cuticulaires et permet d'augmenter ainsi la diffusion des solutés.

Le pilote, conçu et réalisé par MAF Roda a été installé au niveau de la chaîne de précalibrage de la station fruitière Quercy Soleil, à Moissac dans le Tarn-et-Garonne (Figure IV-24). Cependant, tous les modules préconisés n'ont pas pu être mis en place dans le temps imparti.

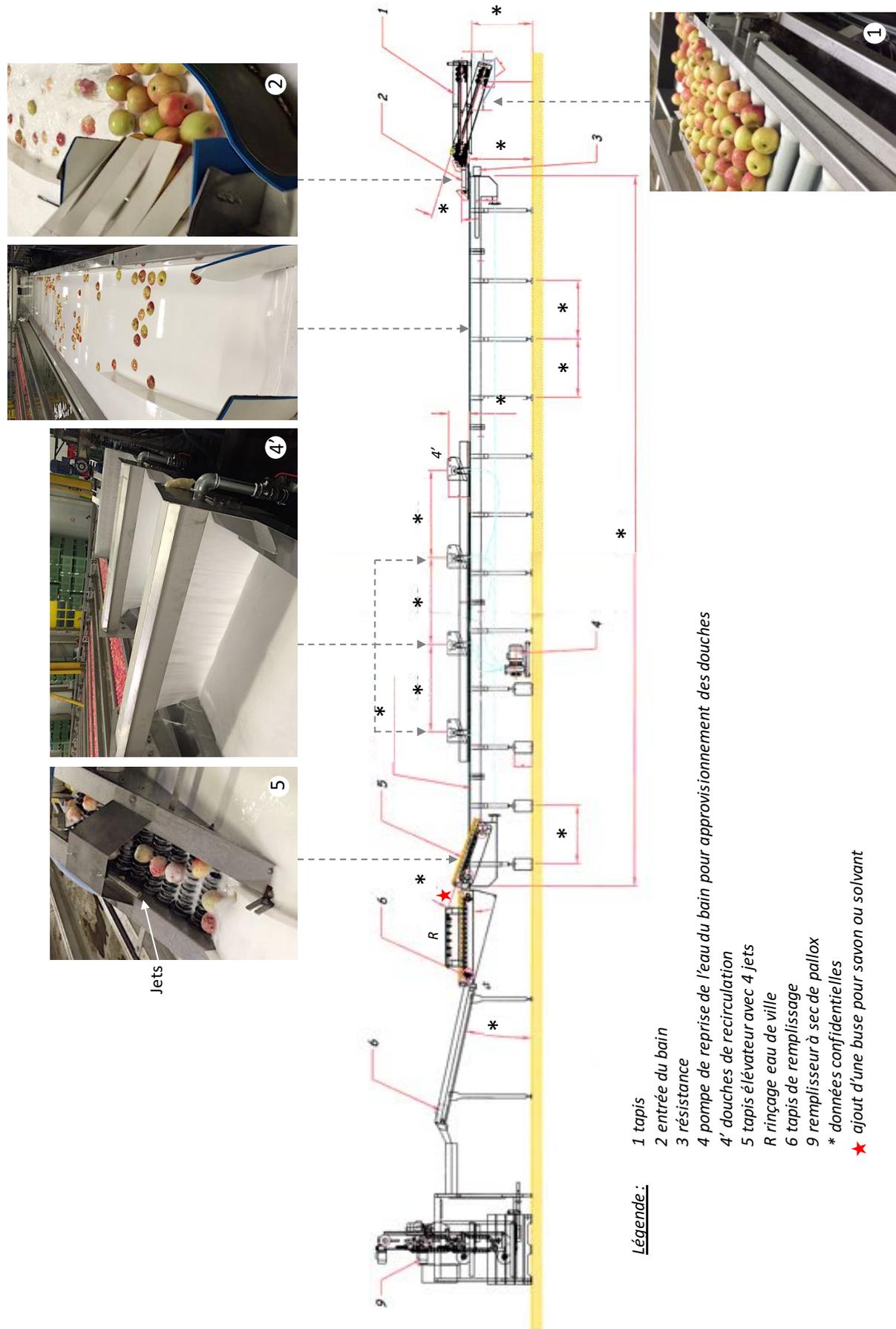


Figure IV-24 : Vue en coupe du pilote industriel LCA

Le pilote est composé d'un seul bain, de volume total supérieur à 1500 m³. Les pommes accèdent au bain soit depuis le précalibrage (Figure IV-24, 1), soit en les déposant directement sur le tapis (Figure IV-24, 2). En effet, le positionnement du pilote sur une des lignes du précalibrage de la station devait permettre d'utiliser la chaîne pour convoier un pallox entier de pommes vers le pilote. Dans un premier temps, nous avons choisi de travailler manuellement à partir de 100 pommes (Figure IV-25). Mais un batch de 100 pommes s'est rapidement avéré impossible à traiter dès lors que les durées de traitement de chaque étape (immersion, jets...) ont été augmentées. Une inhomogénéité au sein du lot était à craindre et, puisque 10 pommes sont prélevées pour analyse, nous avons choisi de traiter des batches de 10 pommes dont l'intégralité est ensuite échantillonnée pour analyse. L'inhomogénéité du traitement est ainsi minimisée.



Figure IV-25 : Echantillonnage des pommes avant essais sur pilote industriel

Dans le bain, les pommes avancent grâce à une pompe qui permet à la solution de circuler en circuit fermé depuis la fin de la ligne jusque sous l'arrivée des pommes depuis le tapis. Aucune autre action ne modifie la trajectoire des fruits qui avancent à la vitesse de recirculation du liquide et qui ne peut pas être modifiée (soit environ 2,5 minutes maximum). Si un temps de pose plus long est nécessaire, il faut arrêter la pompe, et les pommes restent immobiles à la surface du bain comme cela peut être le cas dans les canaux de précalibrage avant d'atteindre le nombre suffisant de pommes pour remplir un pallox (entre 500 et 700 pommes selon les calibres) (Figure IV-26, A).

Une série de quatre douches à débordement (Figure IV-24, 4 et 4') assurent une recirculation de la solution du bain au-dessus des pommes. Cela permet de brasser les fruits en fin du bain d'immersion et de les ralentir avant leur sortie sur un élévateur (Figure IV-26, B).

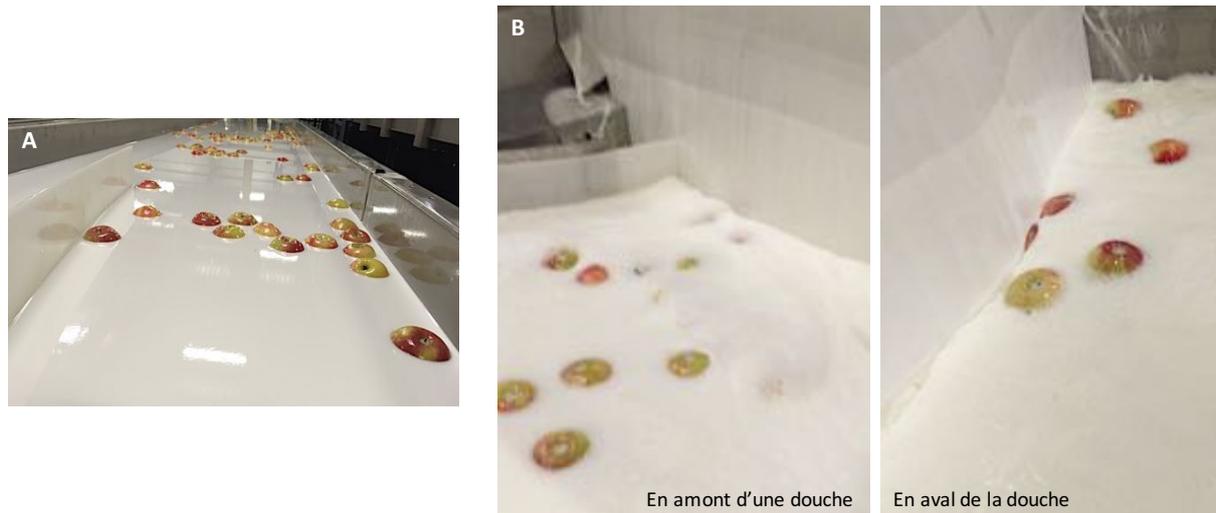


Figure IV-26 : Exemple de pommes dans un bain de traitement (A) en mode d'immersion statique, (B) sous l'action des douches de recirculation de la solution du bain

L'élévateur est équipé de quatre buses et d'une pompe autonome (Figure IV-24, 5). A ce niveau, une autre solution peut être vaporisée mais, un circuit indépendant n'ayant pas été installé, celle-ci retombe dans le bain principal, ce qui modifie au fur et à mesure des essais la composition du bain. Pour une série de 100 pommes, il a été mesuré une consommation de solution à ce niveau entre 6 et 10 L. Les gouttelettes sont très finement dispersées mais les cônes sur lesquels reposent les pommes ne tournent pas sur eux-mêmes et la vitesse de convoyage, réduite au maximum, n'autorise pas un temps de pose suffisant. Ce module en l'état ne permet pas une bonne répartition et une pénétration suffisante du produit. Le tapis de convoyage a été équipé par la suite d'un boîtier électrique de marche/arrêt afin de figer les pommes sous les jets pour optimiser cette étape du process.

L'avant dernier module du pilote correspond à la phase de rinçage (Figure IV-24, R) : elle est composée de six buses très efficaces, reliées à l'eau de ville mais il n'y a pas la possibilité d'ajouter du savon, ni même de chauffer l'eau de rinçage. Une buse et une petite pompe ont donc été rajoutées pour le savon mais aucune solution n'a été proposée pour l'eau chaude (Figure IV-24, emplacement sur étoile rouge).

Enfin, les pommes sont convoyées sur un tapis (Figure IV-24, 6) vers un remplisseur de pallox à sec (Figure IV-24, 9). Les pommes descendent dans le pallox sur des ailettes en plastique le long d'une vis sans fin. Elles ne sont donc pas abîmées en fin de process.

Bien que le cahier des charges n'ait pas été entièrement suivi par MAF Roda pour des raisons de contraintes de positionnement dans la station Quercy Soleil, l'installation en l'état nous a permis néanmoins de compléter nos données pour la transposition industrielle du procédé. Les améliorations à apporter au procédé sont présentées.

4. 2. Critères de sélection des adsorbants et des pommes pour les essais sur pilote industriel

Nous avons évalué au début de nos travaux trois séries de composés pour lesquels une adsorption des molécules de phytosanitaires s'est avérée significative. A ce stade du développement du procédé, des choix ont été faits, tenant compte des propriétés et de l'efficacité avérée des différents adsorbants.

- Ainsi, les adsorbants solides n'ont pas été retenus pour les raisons suivantes :
 - en pénétrant la cuticule, ils sont susceptibles d'augmenter la cristallinité du réseau tridimensionnel et par conséquent la tortuosité du chemin de diffusion des solutés,
 - en association avec d'autres adsorbants, tels que les supports filmogènes, ils diminuent l'efficacité en s'adsorbant probablement sur les sites actifs des autres supports,
 - ils pourraient obturer les buses des jets et/ou abîmer les mécanismes des pompes de recirculation des bains dans le pilote.
- Les adsorbants filmogènes n'ont pas été sélectionnés car :
 - leurs propriétés de gonflement et de gélification au cours du temps qui rend impossible leur application en pilote industriel,
 - la diminution de leur efficacité lorsque les solutés ont pénétré profondément dans la cuticule.
- Quant aux agents vecteurs, dits plastifiants, la capacité désorbante a été démontrée pour les esters d'acides gras (plutôt en C18) et de glycérol (GMS ou E371) et de sorbitane (Tween 80 ou E433) (Cf. § 3. 3.), à des teneurs variant de 33 % à 80 % massique dans l'eau. Ces résultats nous ont conduit à poursuivre la sélection d'additifs supplémentaires avec des longueurs de chaînes variables, au cours d'une étude à l'échelle laboratoire, sur des pommes et leur cuticule de la variété Fuji.

Pour les essais préindustriels, deux agents ont été retenus : le MCT (Medium Chain Triglyceride en C8-C10) et la triacétine ou E1518 (C2). Le Tween 80 a également été sélectionné comme agent d'émulsion entre le MCT ou le E1518, très faiblement hydrosolubles, et l'eau. Trois solvants sont proposés dans ces essais : acétone, éthanol et acétate d'éthyle. Ils sont autorisés dans l'industrie alimentaire (Communauté Européenne 2009 [29]) et l'acétate d'éthyle est de plus un solvant vert. Le Tableau IV-29 résume les principales propriétés physico-chimiques susceptibles d'assurer une extraction efficace des résidus de phytosanitaires dans les épidermes de pommes.

Agent P	V _m (mL/mol)	Distance ¹ P-cires VAR2	Affinité ² P/cires VAR2	Affinité P/cutine (logK _{O/E})	Affinité ² P/phyto (fludioxonil)	RMN (solvation du fludioxonil dans cuticules VAR2)
MCT	534,5	0,57	0,05	C8 : 8,25 C10 : 10,92	0,46	Interaction sur fludioxonil dans cutine et cires
E1518	188,2	3,62	0,32	0,21	0,42	Interaction sur fludioxonil dans cutine et cires
Acétone	73,8	3,76	0,33	- 0,24	0,37	-
Acétate d'éthyle	98,2	1,99	0,17	0,73	0,52	-
Ethanol	58,4	11,19	0,98	- 0,31	1,00	-

Tableau IV-29 : Propriétés physico-chimiques des additifs et solvants sélectionnés pour les essais sur pilote industriel
Légende : ¹Ra et ²RED selon théorie de Hansen

Les pommes Fuji (VAR2) ont été sélectionnées pour les essais sur pilote industriel, en particulier parce qu'elles représentent une catégorie intermédiaire sur les trois variétés sélectionnées pour le projet INNO'POM (Cf. § 2. 1.). En effet, leur période de maturation se situe entre celle des pomme Gala (VAR1) et Pink Lady® (VAR3) et la caractérisation physico-chimique des épidermes a également mis en évidence que ses propriétés en termes de mouillabilité, de composition chimique, de

morphologie des cristaux de cires épicuticulaires, étaient intermédiaires par rapport aux deux autres variétés (Cf. Chapitre II). D'autre part, elles ont été utilisées comme modèle au cours des études antérieures de sélection et de mise au point des formules pour les raisons suscitées. Les essais sont intervenus environ six mois après la récolte des fruits (Figure IV-25).

4. 3. Les paramètres variables des essais

Plusieurs paramètres peuvent être modifiés pour optimiser les taux d'extraction des molécules de phytosanitaires : les quantités de plastifiants, la durée des différentes étapes de traitement ainsi que la température. Dans le cadre de ces essais, le recours à un plan d'expérience n'a pas pu être envisagé car il est difficilement réalisable dans les conditions de mise en œuvre du pilote préindustriel. Chaque opération nécessite du temps et de nombreuses manutentions et implique un coût (matières premières et personnel qualifié) qui doit être pris en compte.

Une des principales causes du coût global d'un essai est liée à la capacité du pilote (> 1500 m³). Il n'est pas envisageable de le remplir de produit pur ou très concentré. Les résultats des évaluations des plastifiants ont montré que pour extraire des teneurs faibles en phytosanitaires, des quantités importantes d'agents sont nécessaires. Les quantités mises en jeu dans ces évaluations étaient comprises entre 0 et 90 % de matière (Cf. § 3. 3.) Par la suite, des solutions de traitement contenant 30 % de matière organique ont été formulées dans le cadre des essais sur pommes en laboratoire (Cf. § 3. 4.). Les agents n'étant pas hydrosolubles, les formules nécessitent 5 % de tensioactif (Tween 80) par tranche de 10 % d'agent dans l'eau. Par conséquent, nous avons choisi d'étudier les formulations à base de MCT ou de triacétine à 10 % (+ 5 % Tween 80) et à 30 % (+ 15 % Tween 80), soit 150 kg (+ 75 kg Tween 80) et 450 kg (+ 225 kg Tween 80) respectivement. Le bain est généralement rempli d'eau puis le Tween 80 est ajouté et brassé pendant une heure environ avec un agitateur. La dissolution complète du Tween nécessite plusieurs heures et le plastifiant n'est ajouté que le lendemain. C'est la pompe de recirculation du bain qui émulsionne le mélange. La modification de la composition du bain principal nécessite une étape de vidange, de nettoyage et de remplissage (eau + Tween), soit environ 24 heures. A cela s'ajoutent les coûts des matières premières (environ 8 €/kg), la gestion éventuelle des déchets (> 1500 L) et de nombreuses étapes de manutention. Dans ces conditions, l'agent pur devra être ajouté par les buses sur l'élévateur en sortie de bain, ou avant le rinçage.

La durée des différentes étapes de traitement peut également varier de quelques minutes (2,5 minutes en fonctionnement normal du pilote) à plusieurs heures. Dans ce cas, la pompe de recirculation du bain du pilote doit être arrêtée. Malheureusement, les pommes ne subissent aucun mouvement et l'homogénéité du traitement peut être compromise (possibilité de démixtion du bain, pommes non intégralement immergées). L'élévateur peut être stoppé sur un temps court, pour une vaporisation plus longue du produit pur par exemple. Mais si le temps de pose doit être allongé, il vaudra mieux soustraire les pommes et les repositionner à l'entrée du rinçage sur le pilote par la suite.

La température du bain peut être contrôlée et chauffée par un thermostat. Le chauffage du bain est relativement long compte tenu du volume mais c'est surtout l'inertie pour refroidir le bain qui est importante. Le thermostat n'a pas été utilisé en raison des petits volumes de pommes à traiter dont la température en sortie de chambre froide n'a pas eu d'impact sur la température ambiante du

bain. Celle-ci a été mesurée autour de $16 \pm 2^\circ\text{C}$ au cours des essais, conformément à ce qui figurait dans le cahier des charges.

En conclusion, **les paramètres de temps, la concentration des matières premières et le nombre de bains et de vaporisation ont été modifiés au cours des essais.**

4. 4. Résultats des essais de décontamination des pommes sur pilote préindustriel

Les teneurs en résidus phytosanitaires ont été analysés sur un échantillon de 10 pommes par un laboratoire de contrôle accrédité. Parmi la sélection des molécules de phytosanitaires retenus pour l'étude (Tableau IV-1), seules cinq ont été identifiées dans les analyses de pommes de la variété 2 saison 2015 utilisées pour ces essais en pilote industriel avant décontamination. Les résultats des différents essais de décontamination des pommes sur pilote préindustriel sont présentés dans le Tableau IV-30.

La teneur en flonicamid correspond à la somme des teneurs en flonicamid et ses métabolites TNFA et TNFG. Le TNFA a été quantifié dans tous les échantillons. La somme flonicamid + TNFA + TNFG est systématiquement soit inférieure à la limite de quantification ($LQ = 0,05 \text{ mg/kg}$), soit non détectée. Lorsque la somme est inférieure à la LQ, la teneur en TNFA est supérieure à sa propre limite de quantification ($LQ = 0,01 \text{ mg/kg}$) ; lorsqu'elle est non détectée, la teneur en TNFA est proche de sa LQ. Par conséquent, le flonicamid sera systématiquement considéré comme non détecté. Le dithianon a été détecté deux fois sur les six répétitions d'analyse de la référence et le fludioxonil trois fois : l'erreur de mesure sur ces deux molécules est très grande. De plus, la teneur moyenne en fludioxonil calculée pour les six répétitions de la référence est inférieure à la limite de quantification ($LQ = 0,01 \text{ mg/kg}$). Ces molécules ne seront donc pas utilisées comme traceurs de décontamination. Dans le cadre du traitement antifongique pour la conservation en chambres, le Bellis (boscalid + pyraclostrobine) et le Geoxe (fludioxonil) sont utilisés indifféremment. Le paramètre qui intervient dans le choix et la fréquence d'application de l'un ou l'autre des deux produits, ce sont les délais avant récolte (DAR). Le DAR du Bellis est de 7 jours tandis que celui du Geoxe est de 3 jours (Cf. II- 3. 5. 1.). Si les semaines qui précèdent la récolte sont pluvieuses, le Bellis sera utilisé le plus fréquemment. Si les jours qui précèdent la récolte sont pluvieux, le Geoxe sera utilisé préférentiellement car il peut être appliqué jusqu'à 3 jours avant la récolte. Par conséquent, cela explique que, au cours des saisons, les teneurs en fludioxonil varient. Il est rare que les pommes traitées ne renferment pas de boscalid et de pyraclostrobine, en particulier dans le cas des variétés tardives plus exposées aux risques fongiques. Notons que ce ne sont que des recommandations de traitement et que chaque producteur est libre d'appliquer les produits de traitement qu'il juge nécessaire sur son exploitation, ce qui peut générer quelques variations entre les lots d'une même saison. La vérification des cahiers de récolte fournit cette information. Il est donc tout à fait probable que pour la saison 2015, le Geoxe ait été moins utilisé que pour la saison 2014, pour laquelle les teneurs en fludioxonil des pommes utilisées pour les essais en laboratoire et les études sur les cuticules étaient beaucoup plus élevées ($0,19 \text{ mg}$ de fludioxonil par kg d'épiderme, le boscalid et la pyraclostrobine n'ont pas été détectés). Le boscalid et la pyraclostrobine ont été identifiés dans la référence et l'écart-type sur les répétitions d'analyse de la référence est faible. Ils seront donc utilisés comme traceurs de décontamination.

Pour des teneurs en boscalid inférieures à $0,025 \text{ mg/kg}$ et celles en pyraclostrobine inférieures à $0,016 \text{ mg/kg}$ (valeurs moyennes moins l'écart-type), l'efficacité du procédé pourra être considérée

comme positive. Pour toutes les teneurs supérieures, le procédé sera considéré comme inefficace. *L'objectif des essais de décontamination en condition pilote est d'atteindre la valeur non détectée pour ces deux résidus. Toutefois, nous avons considéré que lorsque la teneur est inférieure à la LQ, il est également considéré comme non détectable compte tenu de l'erreur de mesure (coefficient de variation de 30 %), le procédé est alors considéré comme totalement efficace.*

Code essai	Teneurs (mg/kg poids frais)				
	Boscalid	Dithianon	Flonicamid	Fludioxonil	Pyraclostrobine
Référence	0,033 ± 0,008	0,066 ± 0,154	ND	0,008 ± 0,009	0,023 ± 0,007
Série 1 : Test MCT avec rinçage savon ou éthanol					
<ul style="list-style-type: none"> ▪ variation de la concentration en additif (10 à 100 %) ▪ Variation de la durée de contact des traitements 					
A1	0,013	ND	ND	ND	0,012
A2	0,034	ND	ND	0,011	0,032
A3	0,047	ND	ND	0,015	0,036
A'2	0,037	ND	ND	0,013	0,022
A'3	0,044	ND	ND	0,039	0,028
B1	0,041	ND	ND	0,020	0,019
B2	0,034	ND	ND	0,018	0,023
Série 2 : Test MCT avec rinçage savon					
<ul style="list-style-type: none"> ▪ variation de la concentration en additif (10 à 100 %) ▪ variation de la durée de contact des traitements ▪ variation de la nature des solvants 					
MAC2	0,015	ND	ND	ND	0,017
MAE2	< LQ	ND	ND	ND	0,011
MAC5	ND	ND	ND	ND	ND
MAE5	ND	ND	ND	ND	ND
Série 3 : Test E1518 avec rinçage savon					
<ul style="list-style-type: none"> ▪ variation de la concentration en additif (30 à 100 %) ▪ variation de la durée de contact des traitements ▪ variation de la nature des solvants ▪ ajout d'étapes de rinçage entre les bains 					
TEt2	0,043	ND	ND	0,022	0,033
TEt15	0,016	ND	ND	<LQ	0,014
TEt60	0,012	ND	ND	0,011	0,015
TEt24	< LQ	ND	<LQ	ND	0,012
T5AC2	0,017	ND	<LQ	ND	0,017
TAE1	0,014	ND	ND	ND	0,012
TAET2	0,034	ND	ND	0,029	0,034
TACT2	0,028	ND	ND	ND	0,018
TAEt5	0,054	ND	ND	0,021	0,034
TAE20''Et5	0,023	ND	ND	ND	0,022
TACet2	0,013	ND	ND	ND	0,018
TACet15	0,010	ND	ND	ND	0,015
A5T2	0,016	ND	ND	ND	0,010
A5T2Et15	0,016	ND	ND	ND	0,010
TAC2	< LQ	ND	ND	ND	< LQ
TAC5	ND	ND	ND	ND	ND
A5T60	< LQ	ND	ND	ND	ND
A2T15Et5	ND	0,010	ND	ND	ND
A5T15Et2	< LQ	ND	ND	ND	ND

Tableau IV-30 : Teneurs en phytosanitaires des pommes après traitement sur pilote industriel (Variété 2) (1/2)

Légende : LQ limite de quantification = 0,01 mg/kg poids frais,

ND non détecté (< LD limite de détection = 0,005 mg/kg poids frais),

Cellules grises = procédé inefficace, cellules vertes = efficacité intermédiaire, surlignage rouge = efficacité totale

Code essai	Teneurs (mg/kg poids frais)				
	Boscalid	Dithianon	Flonicamid	Fludioxonil	Pyraclostrobine
Référence ± ET (n = 6)	0,033 ± 0,008	0,066 ± 0,154	ND	0,008 ± 0,009	0,023 ± 0,007
Série 4 : Test d'une solution unique d'immersion avec rinçage savon <ul style="list-style-type: none"> ▪ variation de la durée d'immersion ▪ variation de la nature de la solution 					
AC5	< LQ	ND	ND	ND	ND
AE5	< LQ	< LQ	ND	ND	ND
Et5	0,021	ND	ND	ND	0,018
Et15	0,014	< LQ	ND	ND	< LQ
ForA	0,014	0,022	ND	0,052	0,010
ForB	0,022	ND	ND	ND	0,019
ForC	0,037	0,012	ND	ND	0,024
ForD	0,017	ND	ND	< LQ	0,014
Série 5 : Test combinaison MCT et E1518 <ul style="list-style-type: none"> ▪ variation de la concentration en additif (30 % à 100 %) ▪ variation de l'ordre des additifs ▪ variation de la composition des rinçages 					
M5T2A5	0,015	ND	ND	ND	ND
T5M2A5	0,014	ND	ND	ND	0,012
T2M5A5	< LQ	ND	ND	ND	ND
A5M5T2	< LQ	ND	ND	ND	< LQ
A5T2M5	< LQ	ND	ND	ND	< LQ
M2T5A5	ND	ND	ND	ND	ND
A5T5M2	ND	ND	ND	ND	ND
A5M2T5	< LQ	ND	ND	ND	< LQ
M5T5A5	ND	ND	ND	ND	ND
T5M5A5	< LQ	ND	ND	ND	ND

Tableau IV-30 : Teneurs en phytosanitaires des pommes après traitement sur pilote industriel (Variété 2) (2/2)

Légende : ET écart-type,

LQ limite de quantification = 0,01 mg/kg poids frais

ND non détecté (< LD limite de détection = 0,005 mg/kg poids frais),

Cellules grises = procédé inefficace, cellules vertes = efficacité intermédiaire, surlignage rouge = efficacité totale

Pour faciliter la discussion des résultats qui suit, les teneurs en boscalid du Tableau IV-30 ont été illustrées sous forme d'histogrammes dans lesquels les résultats inférieurs à la LQ ont été représentés par la valeur de la LQ d'où une légère surestimation des données et les résidus non détectés par 0. Une discussion est proposée sur (i) la nature des solvants utilisés dans les essais pilote (acétone, acétate d'éthyle et éthanol), (ii) l'influence de la durée des traitements sur les taux d'extraction, (iii) l'importance du moyen d'application des traitements (immersion ou vaporisation), (iv) l'efficacité comparée entre le MCT et le E1518, et (v) l'importance de l'ordre des traitements (nature des produits) et des phases de rinçage (élimination des produits de traitement et des molécules de phytosanitaires qu'ils ont solubilisés).

4. 4. 1. Influence de la composition des solutions de traitement

L'extraction des molécules de phytosanitaires dans l'épiderme des pommes est soumise à la réunion de plusieurs paramètres relatifs à la pénétration de la solution de traitement et à la solubilisation des phytosanitaires dans celle-ci. Les formules A, B, C et D sont des mélanges à base de MCT, E1518, E433, éthanol et eau. Elles ont été préparées pour que leur paramètre de solubilité δH varie entre celui de l'acétone (= 7) et celui de l'eau (= 42). Leur efficacité a été testée au cours d'une seule

immersion de cinq minutes. Des immersions dans des solvants purs (éthanol, acétone et acétate d'éthyle) ont également été évaluées. Les résultats sont représentés par les histogrammes de la Figure IV-27.

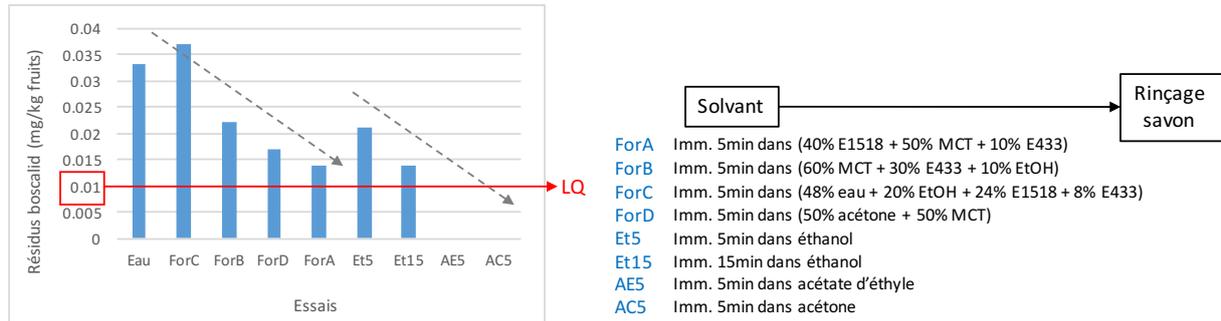


Figure IV-27 : Influence de la composition de la solution de traitement sur la teneur en boscalid après un batch unique d'immersion

Chaque formule A, B, C et D apporte les ingrédients nécessaires à l'extraction des molécules de phytosanitaires mais celle-ci n'est que partielle. Reprenons les hypothèses de travail faisant appel à la théorie de la solubilité de Hansen, et exposées précédemment dans le paragraphe 3. 4. 2. Nous avons calculé les différentes caractéristiques figurant dans le Tableau IV-31 pour chacune des quatre formules testées à partir de leur composition massique en matières premières.

Formule	A	B	C	D	Et	AE	AC
Composition	40 % E1518 50 % MCT 10 % E433	60 % MCT 30 % E433 10 % éthanol	48 % eau 20 % éthanol 24 % E1518 8 % E433	50 % acétone 50 % MCT	100 % éthanol	100 % acétate d'éthyle	100 % acétone
δP	7,96	7,03	12,39	8,49	8,8	5,3	10,4
δH	9,98	12,04	28,11	7,52	19,4	7,2	7
Ra/cires VAR2	1,94	3,69	20,49	1,82	11,19	1,99	3,76
RED/cires VAR2	0,17	0,32	1,80	0,16	0,98	0,17	0,33
RED/boscalid	0,64	0,77	1,88	0,54	1,21	0,66	0,49
VM (mL/mol)	464,96 40% VM=188,2 50% VM=534,5 10% VM=1224,3	693,83 60% VM=534,5 30% VM=1224,3 10% VM=58,4	163,43 48% VM=18 20% VM=58,4 24% VM=188,2 8% VM=1224,3	304,5 50% VM=73,8 50% VM=534,5	58,4	98,2	73,8

Tableau IV-31 : Caractéristiques des formules A, B, C et D et des solvants purs

Les différentes grandeurs relatives aux formules A, B, C et D du Tableau IV-31 ainsi que les teneurs résiduelles en boscalid ont été classées selon un ordre croissant ou décroissant, (Tableau IV-32).

Grandeur physique	Interactions	Classement formules
δP croissant	Interactions dipôle-dipôle croissantes	B < A < D < C
δH croissant	Liaisons hydrogène croissantes	D < A < B < C
Ra décroissant	diffusion croissante	C > B > A > D
RED/cires décroissant	affinité croissante	C >> B > A ≈ D
RED/boscalid décroissant	solubilité	C >> B > A > D
VM décroissant	pénétration croissante	B > A > D > C
Teneur résiduelle en boscalid après traitement (mg/kg fruits) décroissante	efficacité d'extraction croissante	C > B > D > A

Tableau IV-32 : Classement des formules A, B, C et D selon leur efficacité théorique et réelle

Notons que **l'efficacité des formules pour extraire le boscalid est directement liée à leur diffusion dans les cires et à leur capacité à solubiliser le boscalid**. La formule C, la seule à contenir de l'eau (48 %), ne présente aucune efficacité d'extraction.

En revanche, les résultats relatifs aux solvants purs montrent qu'une immersion de cinq minutes dans l'éthanol présente la même efficacité que l'immersion dans la formule B. En multipliant la durée de contact dans l'éthanol par 3, l'immersion devient aussi efficace que celle dans la formule A. Bien que son volume molaire soit le plus petit, la diffusion dans les cires n'est pas favorable (affinité faible). Les équilibres nécessiteront un temps plus long pour s'établir. **L'acétate d'éthyle et l'acétone sont d'excellents solvants du boscalid dans la cuticule**. Leur diffusion dans les cires et l'affinité avec le boscalid sont au moins équivalentes à celles des formules A et D. Il semblerait que le mélange de solvants limite l'efficacité globale de la formule car il fait intervenir des volumes molaires beaucoup plus importants que ceux de l'acétate d'éthyle et de l'acétone. De plus, il est possible que les molécules de volumes molaires plus importants limitent la diffusion des molécules de volumes molaires plus faibles et diminuent l'efficacité globale pour une durée de contact donnée. Ces résultats confirment qu'aucun paramètre ne doit être négligé pour assurer une efficacité optimale d'extraction. Pour la suite des travaux, nous avons multiplié les traitements avec un seul additif (ou solvant) à la fois plutôt que de mélanger les additifs dans un seul traitement.

Dans les expériences de la Figure IV-28, le procédé consiste en une série de trois batches d'immersion avant un rinçage avec savon. La première immersion est de 15 minutes dans une solution pure de MCT ou de E1518 et la seconde est de l'ordre de 2 minutes (15 minutes pour l'essai TET15) dans une solution diluée à 10 % pour le MCT et 30 % pour le E1518. La troisième immersion varie de 2 à 15 minutes dans un solvant (acétone, acétate d'éthyle, éthanol) ou un mélange de solvants (50 % acétone + 50 % E1518).

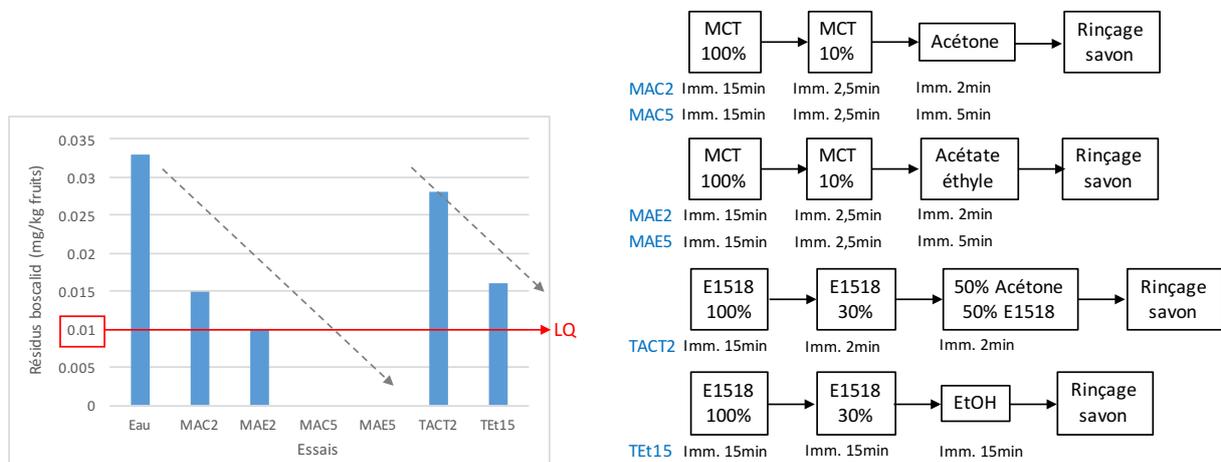


Figure IV-28 : Influence de la composition de la solution de traitement sur la teneur en boscalid après trois batches d'immersion

Dans le cas de MCT, l'immersion de 2 minutes dans l'acétate d'éthyle extrait plus de boscalid dans la cuticule que dans l'acétone car sa diffusion est plus rapide. Lorsque la durée augmente, les résultats obtenus avec les deux solvants (MAC5 et MAE5) sont équivalents et excellents.

Dans le cas de la triacétine, les résultats d'extraction obtenus pour l'essai TACT2 est nettement inférieur à ceux obtenus pour le MCT. Les résultats de l'essai TET15 sont équivalents à ceux de l'essai MAC2. L'éthanol n'est pas le solvant idéal pour le complexe boscalid-cuticules mais si la durée

augmente, il peut concurrencer l'acétone et se révèle meilleur agent d'extraction que le mélange acétone/E1518, dans lequel la présence du E1518 semble diminuer l'action de l'acétone.

Comparons à ce titre l'impact de la dilution de deux solvants (acétate d'éthyle et acétone) dans la triacétine (Figure IV-29). Des essais de décontamination ont été mis en place pour étudier l'évolution de l'efficacité de ces solvants lorsque ceux-ci sont dilués de moitié dans l'agent E1518.

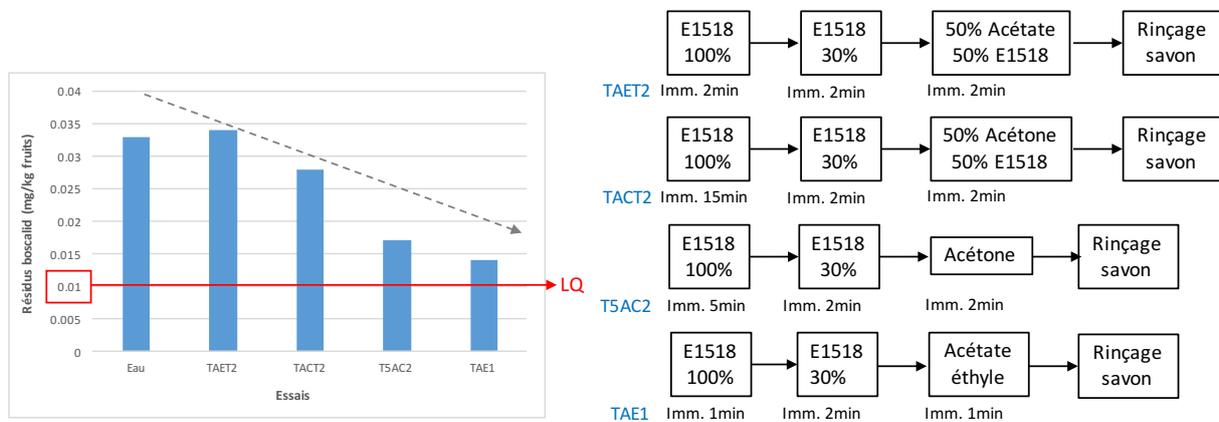


Figure IV-29 : Influence sur la teneur en boscalid de la dilution des solvants dans E1518 dans la troisième étape de traitement avant rinçage

Quelle que soit la durée des étapes préalables de traitement par immersion dans E1518 pur puis dans E1518 à 30 % dans l'eau, **la dilution du solvant, acétate d'éthyle ou acétone, diminue l'efficacité d'extraction.**

Ces différentes expériences tendent à démontrer que **l'acétone et l'acétate d'éthyle sont les meilleurs solvants d'extraction lorsqu'ils sont utilisés purs.** Nous avons cependant remarqué que les traitements avec l'acétate d'éthyle avaient tendance à tâcher les fruits. Aucune explication n'a été proposée. Concernant l'acétone, le temps de contact idéal est fixé à 5 minutes.

4. 4. 2. Influence de la durée des immersions

L'augmentation de la durée des traitements a pour effet d'augmenter la diffusion des solvants dans la cuticule, favoriser la mise en place des équilibres entre les différentes molécules et globalement favoriser l'extraction des molécules de phytosanitaires dans la cuticule.

Pour les deux séries d'essais de la Figure IV-30, nous avons utilisé le E1518, l'éthanol et l'acétone. Dans la première série, les pommes sont soumises à un premier bain d'immersion dans la triacétine pure variant de 2 à 76 minutes, puis à un second bain variant de 2 minutes à 14 heures. Le troisième bain consiste en une immersion dans l'éthanol variant de 2 à 15 minutes. Les résultats montrent que plus la durée des bains augmente, meilleure est l'extraction du boscalid, qui atteint la limite de quantification pour l'échantillon TET24 (durée totale du traitement = 918 minutes soit plus de 15 heures).

Dans la deuxième série d'essais, la première immersion a lieu dans l'acétone pendant 5 minutes, puis dans la triacétine diluée à 30 % dans l'eau d'une durée allant de 2 à 60 minutes. Les résultats obtenus pour l'échantillon A5T60 (LQ) confirment que la durée d'immersion a une influence significative sur l'efficacité d'extraction des résidus phytosanitaires.

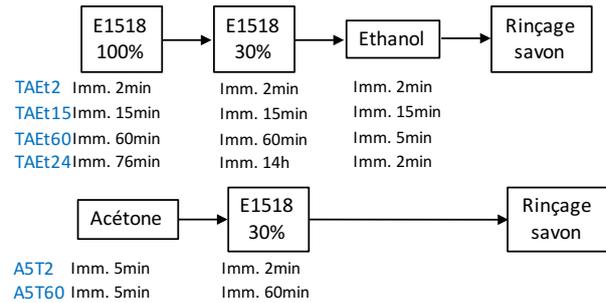
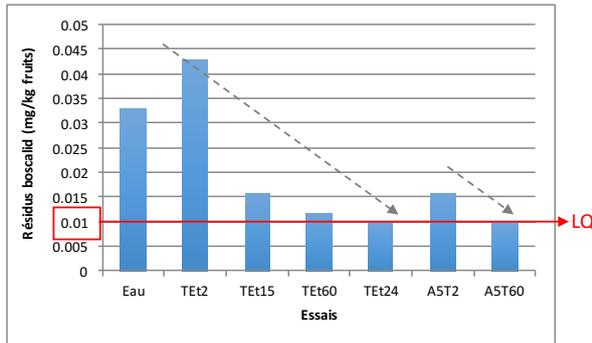


Figure IV-30 : Influence de la durée des traitements par immersion sur la teneur en boscalid

4. 4. 3. Influence du procédé d'application

Sur le pilote industriel, deux modules peuvent être utilisés pour mettre en contact les solutions de traitement et les pommes : le bain (immersion) et l'élévateur muni de buses (vaporisation). Etant donné que la mise en contact est primordiale pour obtenir la meilleure diffusion possible (quantité suffisante pour obtenir le gradient de diffusion) et les meilleurs taux d'extraction (concentration suffisante pour solvater les molécules de phytosanitaires), nous avons évalué l'efficacité des quatre buses de l'élévateur. A cet effet, le MCT a été utilisé pour cette série d'expériences (Figure IV-31). Pour les échantillons A, les pommes ont été immergées dans le MCT à 10 % pendant 60 minutes à 17 heures, puis du MCT pur a été vaporisé. Sauf dans le cas de A1, le MCT vaporisé est maintenu en contact sur les fruits pendant 15 minutes. Les pommes sont ensuite rincées au savon ou à l'éthanol (buse avant rampe de rinçage, Cf. étoile rouge sur Figure IV-24). Les échantillons B, après une première immersion dans MCT à 10 % variant de 2,5 à 60 minutes, n'ont pas été vaporisés avec du MCT pur. Ils sont directement rincés à l'éthanol puis au savon (buse avant rampe de rinçage).

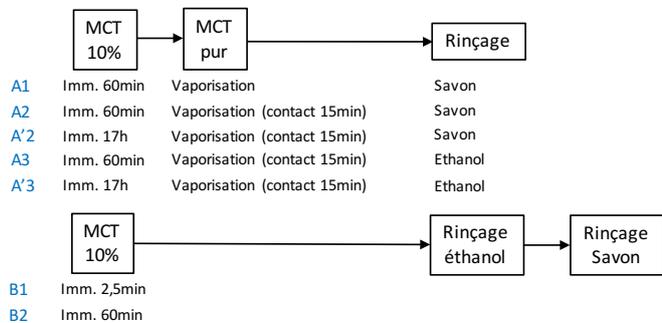
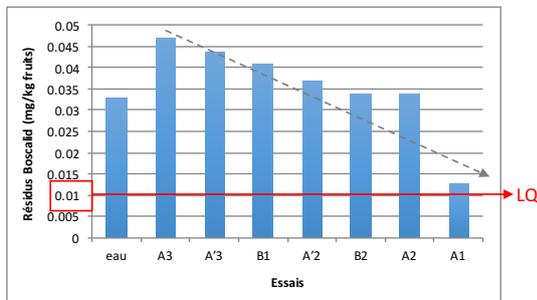


Figure IV-31 : Influence du procédé d'application des traitements (immersion ou vaporisation) sur la teneur résiduelle en boscalid

Seule la teneur résiduelle en boscalid dans l'échantillon A1 est significativement différente de la teneur de référence (eau). Compte tenu des autres résultats, cela n'est pas logique et semble plutôt lié à l'inhomogénéité de l'échantillonnage déjà évoquée au paragraphe 3. 4. 1. En réalité, l'immersion dans le MCT dilué à 10 % ne présente aucune efficacité. Même lorsque la durée de contact augmente (A'2 et A'3), le taux d'extraction du boscalid n'augmente pas. Cela confirme que pour pouvoir extraire des teneurs très faibles en phytosanitaires, il faut augmenter la quantité de MCT. La vaporisation du MCT pur associée à une durée de contact de 15 minutes n'apporte aucun effet significatif sur la capacité à extraire le boscalid. Il est évident que la quantité apportée par les buses, sur une surface déjà recouverte de MCT à 10 % et du Tween 80 à 5 % (perte de l'adhérence par effet

de dilution dans l'eau par la présence du tensioactif), est insuffisante pour la diffusion du MCT et par conséquent une capacité d'extraction optimale.

4. 4. 4. Comparaison des additifs MCT et E1518 en premier bain de décontamination (rinçage acétone)

Les plastifiants MCT et E1518 (triacétine) ont été sélectionnés pour leurs propriétés à diffuser dans la cuticule et à solubiliser les phytosanitaires tels que le fludioxonil dans les différents environnements dans lesquels ils peuvent se loger. Ont-ils des efficacités équivalentes dans des conditions données d'utilisation ? Pour cela, nous avons comparé des échantillons de pommes traités par du MCT d'une part (deux immersions : 15 minutes dans MCT pur puis 2,5 minutes dans MCT à 10 %) et par de la triacétine d'autre part (deux immersions également). Les échantillons sont ensuite immergés 2 ou 5 minutes dans l'acétone avant d'être rincés au savon (Figure IV-32).

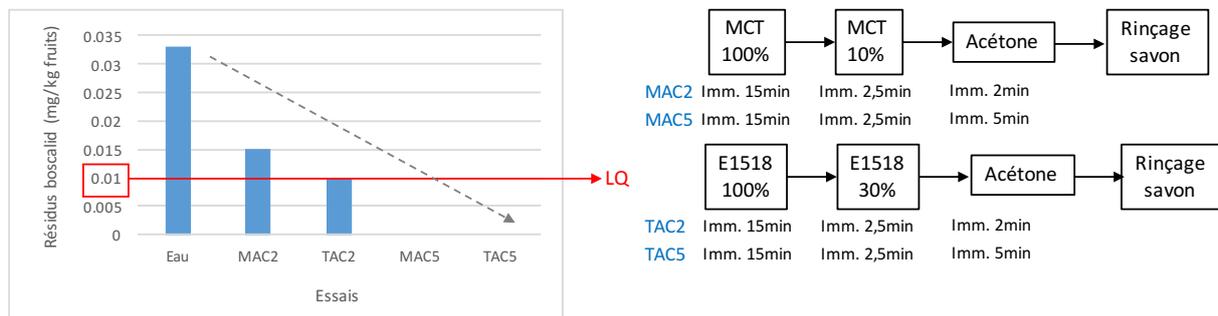


Figure IV-32 : Comparaison MCT et triacétine (E1518) pour un traitement par immersion

Dans le cas des échantillons ayant subi une dernière immersion de deux minutes dans l'acétone, la triacétine se révèle meilleur plastifiant (résultat < LQ = 0,01 mg/kg). Au-delà de deux minutes, tous les résultats (MAC5 et TAC5) sont inférieurs à la LD (= 0,005 mg/kg).

Deux hypothèses peuvent être formulées : (i) soit le MCT, ayant une affinité plus élevée pour l'épiderme que la triacétine, laisse une couche lipidique qui limite l'action de l'acétone dans l'essai MAC2, (ii) soit le MCT, de volume molaire plus grand que la triacétine, est plus difficile à évacuer par l'acétone et nécessite plus de temps. Par conséquent, si la durée d'immersion augmente, l'acétone peut diluer et éliminer le MCT et les résidus de boscalid. Le résultat obtenu est alors de zéro résidu détectable (MAC5).

Les bains de traitement déposent une couche de produits sur l'épiderme des fruits qu'il faut éliminer entre chaque bain pour permettre au suivant de mieux agir.

4. 4. 5. Influence de l'organisation des bains dans le développement du procédé

Les essais expérimentaux précédents ont démontré que le MCT, la triacétine et l'acétone sont susceptibles de conduire aux meilleurs résultats, à condition que le paramètre temps soit optimisé. Les expérimentations ont mis en évidence qu'une succession de traitements était préférable à un seul traitement qui utiliserait des mélanges de solvants. Enfin les étapes de rinçage sont importantes car elles permettent d'éliminer le plastifiant avec les phytosanitaires dissouts.

Dans cette dernière série d'essais (Figure IV-33), le MCT et la triacétine E1518 sont utilisés pur ou dilués à 30 % dans l'eau (+ 15 % de Tween 80). L'acétone est utilisée pure. La triacétine étant soluble dans l'éthanol, l'étape de rinçage pour les échantillons A5T2Et15, A5T15Et2 et A5T15Et5 correspond à une immersion dans l'éthanol. Par la suite, dans un souci de solubiliser également le MCT, c'est

finalement le Tween 80 qui sera dilué à 17 % dans l'éthanol qui sera utilisé pour rincer les pommes après immersion dans le MCT et la triacétine purs. Après immersion dans l'acétone ou les plastifiants dilués, les pommes sont rincées à l'eau. Le savon est utilisé dans le rinçage final.

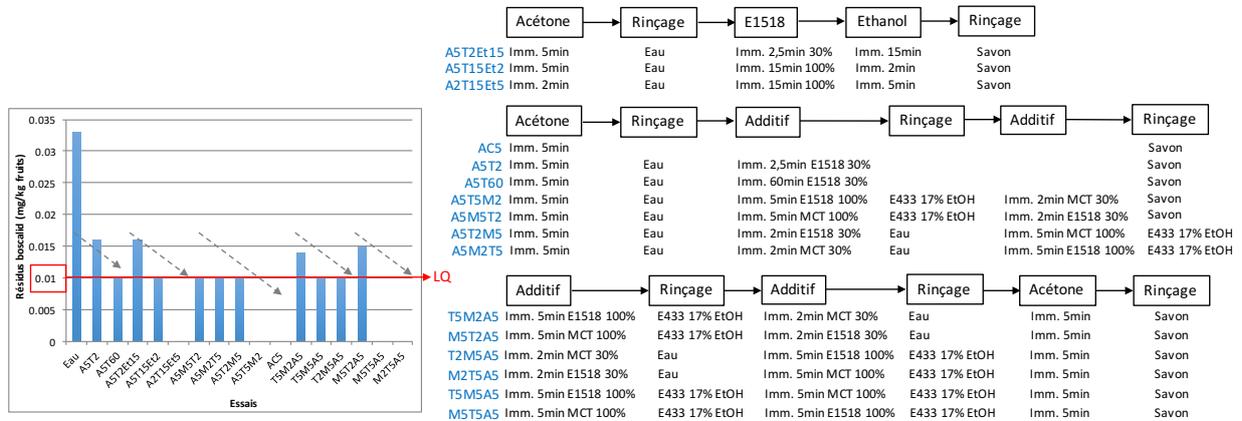


Figure IV-33 : Influence de l'organisation des bains successifs sur la teneur résiduelle en boscalid

Dans la première série d'échantillons, l'acétone (A) a été utilisée en première immersion. Les teneurs résiduelles en boscalid après traitement sont nettement inférieures à la référence (eau) et elles sont majoritairement inférieures à la LQ donc non quantifiables.

Il est évident que l'efficacité des traitements, même s'ils sont composés des meilleurs plastifiants, restent limitée par la teneur initiale en résidus phytosanitaires des pommes et par conséquent par l'inhomogénéité de la matrice et de la répartition des résidus. Plus les résidus seront faibles et leur répartition inégale, plus il faudra augmenter le facteur temps, par exemple (à défaut de la concentration si le produit est utilisé pur) pour augmenter la pénétration du plastifiant jusqu'à l'emplacement des molécules de phytosanitaires. Cela est parfaitement illustré pour les échantillons A5T2, A5T60 et AC5, par exemple. Dans l'échantillon A5T2 pour lequel les pommes sont immergées pendant 5 minutes dans l'acétone puis 2 minutes dans la triacétine à 30 %, il reste 0,016 mg de boscalid par kg de poids frais de fruits. Pour l'échantillon AC5, seulement immergé 5 minutes dans l'acétone, aucun résidu de boscalid n'a été détecté. En multipliant par 30 la durée du second bain dans A5T60, les résidus dans l'échantillon sont alors inférieurs à la LQ.

Pour les échantillons A2T15Et5, A5T5M2 et AC5, les résidus sont inférieurs à la LD. Dans les essais A5T2Et15, A5T15Et2 et A2T15Et5, augmenter la durée d'immersion dans la triacétine (T) plutôt que dans l'éthanol (Et) améliore l'extraction. La triacétine est meilleur solvant des phytosanitaires que l'éthanol.

Parmi les essais A5M5T2, A5M2T5, A5T2M5 et A5T5M2, seul A5T5M2 correspond à zéro résidu détectable. Dans cet essai, l'ordre des bains correspond à l'ordre croissant des volumes molaires des solvants. La triacétine semble plus efficace lorsqu'elle est utilisée pure plutôt que diluée (A5T2M5).

Dans la dernière série d'essais, l'acétone passe en dernier bain d'immersion. Les pommes des échantillons T5M2A5, T5M5A5 et T2M5A5 sont immergées dans un premier bain de triacétine puis dans un second bain de MCT, tandis que celles des échantillons M5T2A5, M5T5A5 et M2T5A5 sont immergés en premier dans le MCT puis ensuite dans la triacétine. Aucun résidu de boscalid n'a été détecté dans les échantillons M5T5A5 et M2T5A5. Notons de nouveau que l'ordre des bains dans ces deux essais correspond à l'ordre décroissant des volumes molaires des solvants mais également la

triacétine est utilisée pure. L'ordre des bains d'immersion semble avoir une incidence non négligeable sur le taux d'extraction des résidus.

Ces résultats démontrent qu'une extraction optimale peut être obtenue moyennant les conditions suivantes :

- **un gradient de solvants doit exister** sur la base de différentes propriétés physico-chimiques telles que la viscosité, la diffusion (volume molaire...), la volatilité... (Tableau IV-33), pour engendrer la mobilité des phytosanitaires

→ acétone – triacétine – MCT

→ MCT – triacétine – acétone

- la triacétine ne doit pas être diluée pour une efficacité optimale « zéro résidu ».

Plastifiant	Acétone	Triacétine	MCT C8C10 55/45
Masse molaire (g/mol)	58,1	218,0	507,8
Volume molaire (mL/mol)	73,8	188,2	534,5
Viscosité dynamique à 20°C (cP)	0,32	23	31
Pression de vapeur saturante à 20°C (mbar)	228	< 1	< 0,001
Distance Ra / acide oléanolique	8,11	7,60	4,70
RED / acide oléanolique	0,84	0,79	0,49
logK _{O/E}	- 0,24	0,21	C8 8,25 C10 10,92
RED / chlorpyrifos (logK _{O/E} = 4,7)	0,19	0,30	0,18
RED / thiamethoxam (logK _{O/E} = - 0,13)	0,53	0,55	0,85

Tableau IV-33 : Caractéristiques physico-chimiques des plastifiants

4. 5. Proposition d'un schéma de désorption des résidus dans la cuticule selon les théories de Hansen, de Hildebrand-Scatchard et des volumes libres

La pénétration d'un composé dans un polymère est régie par deux phénomènes physiques **sorption puis diffusion** (Cotugno *et al.* [30]). Le composé doit se solubiliser à la surface du polymère puis diffuser à travers celui-ci. **L'équilibre de sorption entre le composé et le polymère dépend de la température, de l'affinité composé-polymère et de l'état physique du polymère** (vitreux ou élastique). **La phase de diffusion est catalysée par la température, dépend de la taille et de la forme du composé et de la conformation structurale du polymère (cristallinité, mobilités partielles, présence de groupes chimiques réactifs)** (Cotugno *et al.* [30], Reynier *et al.* 2001 [31], George et Thomas 2001 [32]). La perméabilité P d'un polymère est égale au produit du coefficient de sorption S par le coefficient de diffusion D (Cf. I- 3. 2. 5.). Pour que la perméabilité de la membrane soit maximale, il faut que la solubilité du composé soit élevée (gradient de concentration grand) et son volume molaire faible (Hansen 2000 [1]). Selon la **théorie des volumes libres** reprise en 1992 par Zielinski et Duda [33], **la diffusion d'un composé dépend de la quantité et de la répartition des volumes libres du polymère** (Cf. I- 3. 3. 3. a-). **Dans le cas des polymères vitreux, la quantité de volumes libres est faible, entre 0,2 et 10 %** et la diffusion est plus complexe que dans les polymères caoutchouteux (George et Thomas 2001 [32]). **En ajoutant un plastifiant, les volumes libres du plastifiant s'ajoutent à ceux existant dans le polymère, facilitant ainsi une mobilité locale au sein du polymère.** La diffusion des composés est alors d'autant plus rapide que leur concentration et l'effet plastifiant augmente localement.

La cuticule se présente comme un polymère hydrophobe particulier en ce sens qu'il s'agit d'une membrane biologique. **Elle contient une certaine quantité d'eau sorbée.** L'eau est réputée être un excellent plastifiant car son volume molaire est très petit (18 mL/mol) et son potentiel à former des liaisons hydrogène est élevé. **Mais les contaminants hydrophobes ne sont pas ou très peu hydrosolubles. D'après Hildebrand-Scatchard, un solvant qui se déplace libre un volume défini qui lui est propre. Ce volume laissé libre peut être remplacé par un autre solvant** (Wypych 2001 [34]). L'interaction solvant-soluté intervient lorsque le solvant et la zone du polymère dans laquelle il réagit sont caractérisés par les mêmes masses moléculaires. **Selon cette théorie, le coefficient de diffusion d'un solvant dépend de sa masse moléculaire.** Quand la masse moléculaire augmente, la vitesse de diffusion augmente.

Les volumes occupés par l'eau, l'acétone, la triacétine et le MCT augmentent progressivement de l'eau à l'acétone, de l'acétone à la triacétine et de la triacétine au MCT. Selon la théorie de Hildebrand-Scatchard, la vitesse de diffusion va augmenter graduellement dans le sens acétone → MCT ou diminuer graduellement dans le sens MCT → acétone. **Le gradient de diffusion entraîne les solutés (résidus phytosanitaires) dans les déplacements de solvant au travers du polymère.**

Tant que le plastifiant reste dans la cuticule, les interactions plastifiant-phytosanitaires s'établissent et affaiblissent les interactions phytosanitaires-cuticule. Ensuite, il faut éliminer le plastifiant pour éliminer les molécules qu'il aura solvatées. La phase de rinçage apparaît donc comme une étape cruciale pour l'optimisation de l'extraction des résidus. Tant qu'il reste des molécules de plastifiant dans la cuticule, il reste des résidus. Cette phase de rinçage obéit aux mêmes lois que celles de la pénétration des plastifiants. **Le choix des solvants de rinçage est donc aussi crucial car ces derniers doivent pénétrer dans la cuticule pour se substituer aux complexes plastifiants-résidus.**

4. 6. Bilan des essais de décontamination sur pommes en pilote préindustriel

En conclusion, parmi les 48 combinaisons évaluées en condition pilote préindustriel (Tableau IV-30), seize présentent une efficacité remarquable pour les cinq phytosanitaires sélectionnés pour l'étude (Tableau IV-1).

Le choix définitif de la combinaison dépendra des contraintes du procédé industriel, liées à la surface disponible et à la mise en œuvre d'un équipement répondant aux mesures de sécurité pour son implantation, ainsi que des durées de traitement maximales envisageables sur le site industriel (≥ 5 minutes). Le coût élevé des matières premières est une donnée importante à prendre en compte également dans la conception finale de la chaîne de décontamination de façon à minimiser les volumes morts et ceux des zones de traitements. Deux dispositions peuvent être envisagées : (i) les bains successifs sont installés sur une ligne et une série d'élévateurs munis de douches assurent à la fois le rinçage et le transfert d'un bain à l'autre (Figure IV-34, A), ou (ii) chaque bain correspond à une seule ligne de traitement et un rinçage est effectué en fin de chaque ligne avant le transfert des pommes sur la ligne suivante (Figure IV-34, B). A ce niveau du développement du procédé, **le facteur le plus important est la durée de traitement, étant donné l'inhomogénéité avérée de la répartition des molécules de phytosanitaires et de la composition de la cuticule.** Par conséquent, dans les conditions opératoires données, plus la durée sera importante, plus les résultats seront probants (répétabilité du « zéro résidu »). La chaîne de contamination mise en œuvre doit pouvoir permettre

une **gestion totale des durées de mise en contact des plastifiants avec les pommes** à tous les niveaux de celle-ci.

Le procédé développé dans le cadre de ces travaux de thèse est à l'heure actuelle **transposable à l'échelle industrielle** et à l'étude chez MAF Roda.

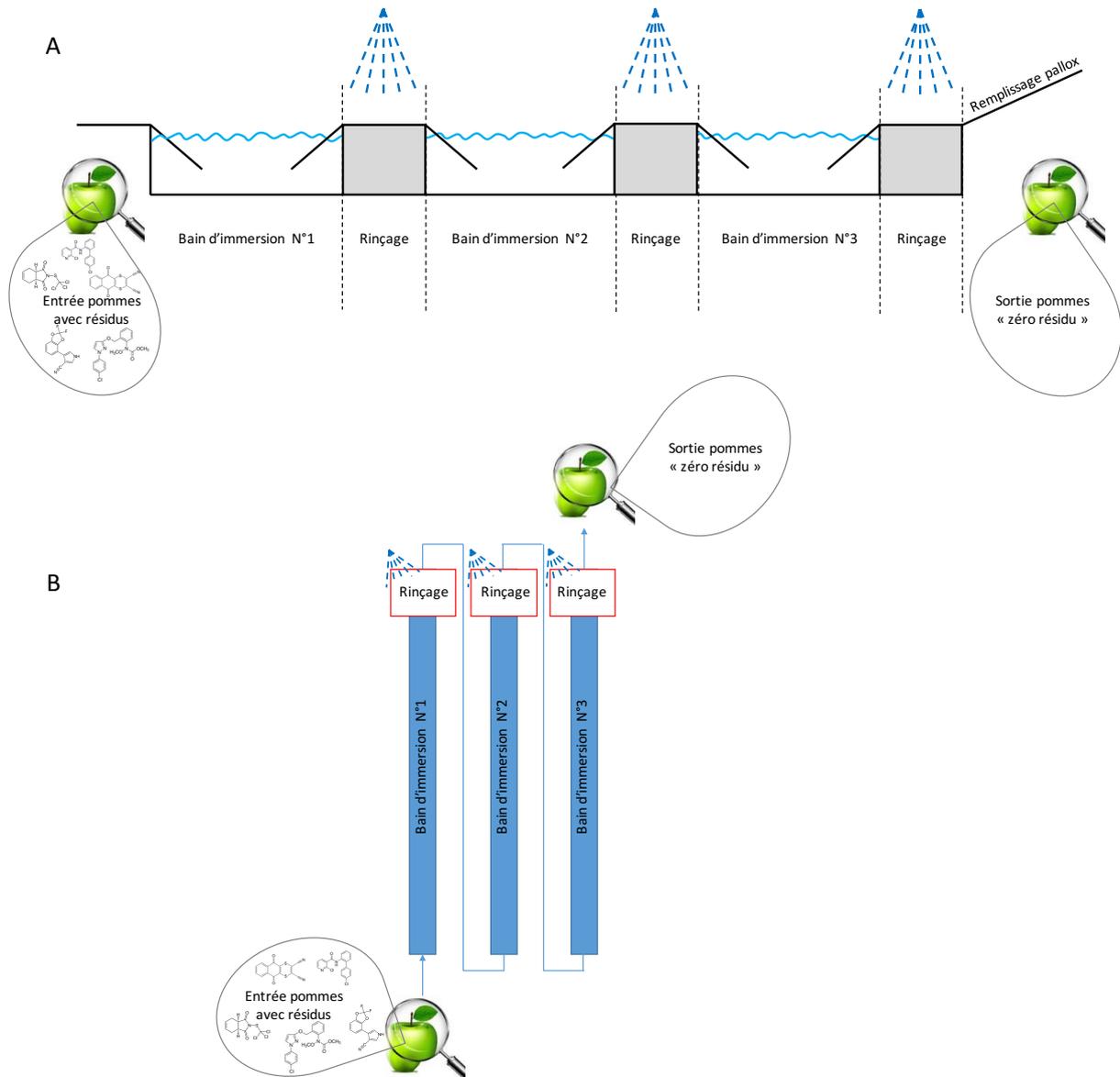


Figure IV-34 : Propositions schématiques du procédé de décontamination des pommes

5. Conclusion

Les résidus phytosanitaires pénètrent dans la cuticule des végétaux et la rémanence de certains peut être très longue. Actuellement, tous les produits issus de l'agriculture non biologique sont traités et aucun procédé ne permet à notre connaissance de décontaminer les fruits et légumes jusqu'à obtenir un zéro résidu détectable. **Pour qu'un plastifiant, dans un procédé intégré de traitement, puisse extraire tous les résidus, il faut qu'il puisse interagir avec les membranes cuticulaires afin de se solubiliser à la surface puis de diffuser, pour ensuite solubiliser les résidus.** Le complexe plastifiant-résidu doit à son tour être éliminé. L'étude préliminaire sur la composition physico-

chimique et structurale des cuticules (Cf. Chapitre II) a mis en évidence une hétérogénéité importante sur deux plans, transversal et longitudinal. Il semble logique, et cela a été vérifié expérimentalement, que la répartition des molécules de phytosanitaires dans l'épiderme des pommes ne peut pas être homogène et régulière. **La difficulté d'extraire ces molécules réside à deux niveaux : (i) leur degré de pénétration dans l'épiderme qui dépendra du délai entre la pulvérisation et le calibrage ou le conditionnement, et (ii) leur concentration.** L'étude de la mobilité d'une molécule témoin de phytosanitaire, le fludioxonil, dans la cuticule des pommes Fuji dans le chapitre II a mis en évidence que la molécule se répartit dans la cuticule dans deux environnements distincts : l'un dans lequel elle est majoritairement mobile (cutine) et un autre où sa mobilité est plus limitée, probablement en forte interaction avec les composés des cires cuticulaires, dont l'acide oléanolique qui est le composé majoritaire des cires de Fuji. **L'ajout de plastifiants a pour effet d'augmenter la mobilité du fludioxonil dans la cuticule, sans modifier la conformation des molécules de cutine mais en agissant en partie sur la mobilité des cires en interagissant avec les structures cristallines. Les résidus les plus accessibles et les moins en interaction avec la matrice sont certainement extraits les premiers. Par conséquent, si la durée de réaction augmente, les résidus les plus liés pourront être extraits.** En présence de plastifiants, deux cas de figures se présentent. Certains comme le E477, le E1518 et le MCT solvatent le fludioxonil dans ses deux environnements. Les autres ne solvatent que le fludioxonil le plus mobile. D'un point de vue cinétique, la quantité de fludioxonil solvaté dépend des propriétés physico-chimiques des plastifiants et des équilibres plastifiant-cuticule et plastifiant-fludioxonil. Après optimisation des durées de réaction, les additifs E477, E1518 et MCT s'avèrent être de bons plastifiants.

L'ensemble des essais sur pilote préindustriel et les résultats obtenus en terme de résidus phytosanitaires ont montré qu'il était possible d'atteindre le « zéro résidu » dans les pommes à condition que plusieurs facteurs soient réunis :

(i) La nature des plastifiants (taille, forme, propriétés), la composition chimique et l'organisation structurale de la cuticule impactent le procédé dans la mesure où la sorption et la diffusion des plastifiants pour un temps d'action donné sont les étapes limitantes pour la phase de solubilisation des résidus. L'acétone puis l'acétate d'éthyle sont d'excellents plastifiants. L'éthanol peut être utilisé mais son pouvoir solvant étant moins important, il faudra l'associer à d'autres plastifiants et/ou augmenter le temps d'immersion. Le MCT et la triacétine sont complémentaires des plastifiants précédents. Ils sont utilisés en combinaisons binaires ou ternaires. Dans ces conditions, la triacétine a systématiquement un effet plus important sur les taux d'extraction des résidus. Il faut noter qu'à la base c'est un très bon solvant des phytosanitaires alors que le MCT sera meilleur solvant des phytosanitaires lipophiles.

(ii) La dilution des plastifiants tend à diminuer la capacité d'extraction du procédé, à l'exception du MCT pour lequel il n'a pas été relevé de différences qu'il soit utilisé pur ou à 30 % aqueux. Il est préférable d'utiliser les agents séparément à l'aide de plusieurs bains par exemple que de les mélanger en un seul et unique bain.

(iii) Le processus d'extraction est temps dépendant. Ceci est d'autant plus vrai que les agents utilisés vont pénétrer plus ou moins facilement dans la matrice et diffuser plus ou moins lentement. Un temps minimal de 5 minutes par agent a été la plupart du temps constaté.

(iv) Enfin, le procédé en lui-même est garant de l'efficacité globale des agents mis en jeu. En effet, en premier lieu, le mode d'application intervient directement dans la **mise en contact des agents avec**

le phytosanitaire dans la matrice. Cette mise en contact doit être suffisamment intime et efficace pour que l'agent pénètre et diffuse largement pour déloger les phytosanitaires dans leurs sites d'accumulation. Il est possible que la vaporisation sous forme de brouillards, si elle est moins consommatrice de produit, n'apporte pas la quantité suffisante d'agent pour une mise en contact optimale. De plus **le facteur temps ne paraît pas maîtrisable avec les jets.** Pour ces raisons, un **système de petits bains successifs** a été préféré, avec succès. En parallèle, il est apparu que **l'ordre de succession des bains** paraissait important dans l'objectif d'un zéro résidu détectable. Parmi les nombreux essais réalisés, un ordre de passage des pommes dans les bains s'est imposé de façon à **créer un gradient sur la base des différentes propriétés physico-chimiques** que présentent les trois agents, qui facilitera l'action de l'agent suivant.

Enfin, **la phase de rinçage primordiale** permet d'éliminer l'agent avec les résidus qu'il aura solubilisés. Elle pourrait être réalisée par pulvérisation au moyen de jets.

Remerciements

Ces travaux ont pu être réalisés grâce à la collaboration des sociétés BLUEWHALE, QUERCY SOLEIL et MAF Roda ainsi que de l'Institut de Chimie de Toulouse (ICT) en la personne du Docteur Yannick COPPEL du Service Commun de RMN du Laboratoire de Chimie de Coordination pour sa collaboration dans toutes les études par RMN du solide.

Références bibliographiques

- [1] C.M. Hansen, Hansen solubility parameters: a user's handbook, CRC Press, 2000.
- [2] C. Jaeger, F. Hemmann, EASY: a simple tool for simultaneously removing background, deadtime and acoustic ringing in quantitative NMR spectroscopy--part I: basic principle and applications, *Solid State Nucl. Magn. Reson.* 57–58 (2014) 22–28. doi:10.1016/j.ssnmr.2013.11.002.
- [3] G. Giry, J. Ayele, C. Gauthier, Elimination du Carbendazime Contenu dans des Eaux de Conditionnement de Fruits par Adsorption sur Différents Matériaux Removal of Carbendazim from Fruit Conditioning Waters by Adsorption on Different Materials, *Environ. Technol.* 22 (2001) 803–811. doi:10.1080/095933322086180319.
- [4] G. Kyriakopoulos, D. Doulia, E. Anagnostopoulos, Adsorption of pesticides on porous polymeric adsorbents, *Chem. Eng. Sci.* 60 (2005) 1177–1186. doi:10.1016/j.ces.2004.09.080.
- [5] K. Agdi, A. Bouaid, A.M. Esteban, P.F. Hernando, A. Azmani, C. Camara, Removal of atrazine and four organophosphorus pesticides from environmental waters by diatomaceous earth-remediation method, *J. Environ. Monit.* 2 (2000) 420–423. doi:10.1039/b004740f.
- [6] A.G. Cunha, A. Gandini, Turning polysaccharides into hydrophobic materials: a critical review. Part 2. Hemicelluloses, chitin/chitosan, starch, pectin and alginates, *Cellulose.* 17 (2010) 1045–1065. doi:10.1007/s10570-010-9435-5.
- [7] Z. Karim, R. Adnan, The β -cyclodextrin-chitosan inclusion complex: Characterization and application in the removal of pesticides in wastewater, *Arch Env. Sci.* (2012) 1–12.
- [8] K. Yoshizuka, Z. Lou, K. Inoue, Silver-complexed chitosan microparticles for pesticide removal, *React. Funct. Polym.* 44 (2000) 47–54.
- [9] E. Wild, J. Dent, J.L. Barber, G.O. Thomas, K.C. Jones, A Novel Analytical Approach for Visualizing and Tracking Organic Chemicals in Plants, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 4195–4199. doi:10.1021/es049915u.
- [10] M. Riederer, L. Schreiber, Waxes - The transport barriers of plant cuticles, in: R.J. Hamilton (Ed.), *Waxes Chem. Mol. Biol. Funct.*, The Oily Press, 1995.
- [11] Z. Liu, Confocal laser scanning microscopy - an attractive tool for studying the uptake of xenobiotics into plant foliage, *J. Microsc.-Oxf.* 213 (2004) 87–93.
- [12] J. Schönherr, Effects of monodisperse alcohol ethoxylates on mobility of 2,4-D in isolated plant cuticles, *Pestic. Sci.* 38 (1993) 155–164. doi:10.1002/ps.2780380210.
- [13] J. Schönherr, Effects of alcohols, glycols and monodisperse ethoxylated alcohols on mobility of 2,4-D in isolated plant cuticles, *Pestic. Sci.* 39 (1993) 213–223. doi:10.1002/ps.2780390308.
- [14] P. Baur, H. Marzouk, J. Schönherr, H. Bauer, Mobilities of organic compounds in plant cuticles as affected by structure and molar volumes of chemicals and plant species, *Planta.* 199 (1996) 404–412. doi:10.1007/BF00195732.
- [15] L. Schreiber, Review of sorption and diffusion of lipophilic molecules in cuticular waxes and the effects of accelerators on solute mobilities, *J. Exp. Bot.* 57 (2006) 2515–2523. doi:10.1093/jxb/erj173.

- [16] A. Buchholz, Characterization of the diffusion of non-electrolytes across plant cuticles: properties of the lipophilic pathway, *J. Exp. Bot.* 57 (2006) 2501–2513. doi:10.1093/jxb/erl023.
- [17] H. Bauer, J. Schönherr, Determination of mobilities of organic compounds in plant cuticles and correlation with molar volumes, *Pestic. Sci.* 35 (1992) 1–11. doi:10.1002/ps.2780350102.
- [18] L. Schreiber, A Mechanistic Approach Towards Surfactant/Wax Interactions - Effects of Octaethyleneglycolmonododecylether on Sorption and Diffusion of Organic-Chemicals in Reconstituted Cuticular Wax of Barley Leaves, *Pestic. Sci.* 45 (1995) 1–11.
- [19] L. Schreiber, J. Schönherr, Mobilities of organic compounds in reconstituted cuticular wax of barley leaves: Determination of diffusion coefficients, *Pestic. Sci.* 38 (1993) 353–361. doi:10.1002/ps.2780380413.
- [20] C.G. Casado, A. Heredia, Structure and dynamics of reconstituted cuticular waxes of grape berry cuticle (*Vitis vinifera* L.), *J. Exp. Bot.* 50 (1999) 175–182. doi:10.1093/jxb/50.331.175.
- [21] M.E. Leser, L. Sagalowicz, M. Michel, H.J. Watzke, Self-assembly of polar food lipids, *Adv. Colloid Interface Sci.* 123–126 (2006) 125–136. doi:10.1016/j.cis.2006.07.003.
- [22] M.D. Chatzidaki, N. Arik, J. Monteil, V. Papadimitriou, F. Leal-Calderon, A. Xenakis, Microemulsion versus emulsion as effective carrier of hydroxytyrosol, *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 137 (2016) 146–151. doi:10.1016/j.colsurfb.2015.04.053.
- [23] D. Mota-Sanchez, B. Gregg, E. Hoffmann, J. Flore, J.C. Wise, Penetrative and Dislodgeable Residue Characteristics of C-14-Insecticides in Apple Fruit, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 2958–2966.
- [24] R.R. Rasmussen, M.E. Poulsen, H.C.B. Hansen, Distribution of multiple pesticide residues in apple segments after home processing, *Food Addit. Contam. Part -Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 20 (2003) 1044–1063.
- [25] M. Durand, Propriétés physico-chimiques, fonctionnelles et applicatives des éthers courts d'isosorbide, thèse de doctorat, Université de Lille 1, 2010. <http://www.theses.fr/2010LIL10196> (consulté le 09 Août 2016).
- [26] X. Steeman, Problematic compounds : Dithianon, (2014). [http://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file//NRL%20experiences_XaverSteemann\(2\).pdf](http://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file//NRL%20experiences_XaverSteemann(2).pdf) (consulté le 30 Juin 2016).
- [27] B. Chen, B. Xing, Sorption and Conformational Characteristics of Reconstituted Plant Cuticular Waxes on Montmorillonite, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 8315–8323. doi:10.1021/es050840j.
- [28] A. Buchholz, P. Baur, J. Schönherr, Differences among plant species in cuticular permeabilities and solute mobilities are not caused by differential size selectivities, *Planta.* 206 (1998) 322–328. doi:10.1007/s004250050407.
- [29] Directive 2009/32/CE du Parlement Européen et du Conseil, 2009. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:141:0003:0011:FR:PDF> (consulté le 30 Juin 2016).
- [30] S. Cotugno, G. Mensitieri, P. Musto, L. Nicolais, Water sorption and transport in polymers. <http://www.caimateriali.org/?id=33> (consulté le 30 Juin 2016).
- [31] A. Reynier, P. Dole, S. Humbel, A. Feigenbaum, Diffusion coefficients of additives in polymers. I. Correlation with geometric parameters, *J. Appl. Polym. Sci.* 82 (2001) 2422–2433.

doi:10.1002/app.2093.

[32] S.C. George, S. Thomas, Transport phenomena through polymeric systems, *Prog. Polym. Sci.* 26 (2001) 985–1017. doi:10.1016/S0079-6700(00)00036-8.

[33] J.M. Zielinski, J.L. Duda, Predicting polymer/solvent diffusion coefficients using free-volume theory, *AIChE J.* 38 (1992) 405–415. doi:10.1002/aic.690380309.

[34] G. Wypych, *Handbook of solvents*, ChemTec Publishing, Toronto, Canada, 2001.

Annexes

Annexe 1 : Variabilité des témoins de contamination des épidermes de pommes Fuji (variété 2) par le boscalid et la pyraclostrobine :

Echantillon	Boscalid (mg/kg de peaux)	Pyralostrobine (mg/kg de peaux)
Blanc matrice	Nd (0,1 en CPG/SM)	1,1 (0,2 en CPG/SM)
Témoin contamination	3,7	11,1
Témoin H2O	1,8	12,7
Témoins contamination après 24 heures	1,3	6,4
	1,5	9,9
	0,7	4
	1,8	9,9
	0,5	9,8
	0,5	2,9
	0,7	3,1
	2,3	10,2

Echantillon	Boscalid (mg/kg de peaux)	Pyralostrobine (mg/kg de peaux)
Témoins contamination après 10 jours	1,8	8,2
	2,5	12,2
	4	15,1
	2,6	11,2
	2,5	11,8
	1,5	9,1
	1,5	10,3

Légende : Nd = non détecté ;

- Les valeurs surlignées en gris sont inférieures à la valeur moyenne fixée pour le calcul des taux d'extraction ;
- Les valeurs surlignées en rose sont supérieures à la valeur moyenne.

N.B. Ces valeurs ne sont pas comptabilisées dans la moyenne des teneurs de référence en boscalid et pyraclostrobine après contamination.

Annexe 2 : Résultats des essais d'extraction sur supports adsorbants solides du chlorpyrifos-Et / Pyrinex à 500 ng/ μ L dans l'eau

Adsorbant	Masse adsorbant (mg)	Rendement extraction %	Moy
M1	3000	- 103	- 74
		- 45	
M2	3000	- 161	- 141
		- 121	
M5	150	- 67	- 63
		- 59	
M4	1500	100	100
		100	
M3	1500	78	74
		70	
O1	1500	84	88
		91	
O3	1500	91	88
		84	
O4	1500	85	85
		85	
O2	6000	36	16
		- 5	

nr non réalisé

Adsorbant	Masse adsorbant (mg)	Rendement extraction %	Moy
M1	nr	-	-
		-	
M2	nr	-	-
		-	
M5	150	100	100
		100	
M4	150	100	100
		99	
M3	150	33	38
		44	
O1	150	4	9
		13	
O3	150	60	60
		60	
O4	150	39	60
		81	
O2	600	98	99
		100	

Annexe 3 : Résultats des essais d'extraction sur supports adsorbants solides du chlorpyrifos-Et / Pyrinex à 0,5 ng/ μ L dans l'eau

Adsorbant	Masse adsorbant (mg)	Rendement extraction %	Moy
M1	3000	- 1096	- 878
		- 661	
M2	3000	- 262	- 226
		- 190	
M5	150	- 45	- 99
		- 154	
M4	150	100	100
		100	
M3	150	100	100
		100	
O1	150	100	64
		28	
O3	150	- 588	- 588
		- 588	
O4	150	- 226	- 226
		- 226	
O2	600	28	- 63
		- 154	
O2	60	- 987	- 933
		- 878	

Annexe 4 : Résultats des essais d'extraction sur supports adsorbants solides du chlorpyrifos-Et / Pyrinex à 10 ng/μL dans l'eau

Temps de contact 15 minutes

Adsorbant	Masse adsorbant (mg)	Rendement extraction %	Moy
M5	150	- 182	- 129
		- 76	
M3	150	- 121	- 198
		- 274	
O1	150	- 274	- 373
		- 473	
O3	150	- 106	- 26
		54	
O4	150	39	24
		8	
O2	600	- 83	- 114
		- 144	

Temps de contact 60 minutes

Adsorbant	Masse adsorbant (mg)	Rendement extraction %	Moy
M5	150	- 60	- 56
		- 53	
M3	150	62	- 41
		- 144	
O1	150	- 236	- 270
		- 305	
O3	150	100	20
		- 60	
O4	150	39	54
		69	
O2	600	- 91	- 259
		- 427	

Annexe 5 : Résultats des essais d'extraction sur supports adsorbants solides du fludioxonil / Geoxe à 400 ng/μL dans l'eau

Adsorbant	Masse adsorbant (mg)	Rendement extraction %	Moy
M1	3000	99	98
		97	
M2	3000	94	96
		97	
M5	1500	87	88
		88	
M4	1500	100	100
		100	
M3	1500	100	100
		100	
O1	1500	84	81
		77	
O3	1500	91	93
		95	
O4	1500	98	95
		93	
O2	600	65	64
		62	

Adsorbant	Masse adsorbant (mg)	Rendement extraction %	Moy
M1	1200	71	71
		70	
M2	1200	70	83
		96	
M5	150	92	95
		98	
M4	150	100	100
		100	
M3	150	79	79
		78	
O1	150	56	59
		63	
O3	150	94	97
		99	
O4	150	96	96
		96	
O2	240	69	77
		86	

Annexe 6 : Résultats des essais d'extraction sur supports adsorbants solides du flonicamid / Teppeki à 140 ng/µL dans l'eau

Adsorbant	Masse adsorbant (mg)	Rendement extraction %	Moy
M1	3000	65	70
		76	
M2	3000	11	32
		52	
M5	1500	16	29
		43	
M4	1500	15	30
		45	
M3	1500	24	20
		16	
O1	1500	58	65
		72	
O3	1500	51	58
		65	
O4	1500	41	32
		23	
O2	600	67	42
		17	

Adsorbant	Masse adsorbant (mg)	Rendement extraction %	Moy
M1	420	61	49
		36	
M2	420	HG	-
		HG	
M5	150	50	50
		HG	
M4	150	HG	-
		HG	
M3	150	HG	-
		HG	
O1	150	44	44
		HG	
O3	150	64	69
		74	
O4	150	89	89
		89	
O2	80	64	78
		92	

Légende : HG = hors gamme

Annexe 7 : Résultats des essais d'extraction sur supports adsorbants solides du boscalid et de la pyraclostrobine / Bellis à 800 ng/µL dans l'eau

Adsorbant	Masse adsorbant (mg)	Rendement extraction Bos %	Moy
M1	3000	96	95
		94	
M2	3000	98	96
		95	
M5	1500	97	97
		97	
M4	1500	100	100
		100	
M3	1500	100	100
		100	
O1	1500	94	94
		94	
O3	1500	98	98
		98	
O4	1500	98	98
		98	
O2	600	90	91
		92	

Rendement extraction Pyra %	Moy
99	100
100	
100	100
100	
58	65
72	
100	100
100	
100	100
100	
- 20	- 18
- 16	
100	100
100	
99	100
100	
- 17	- 5
7	

Adsorbant	Masse adsorbant (mg)	Rendement extraction Bos %	Moy
M1	1200	98	98
		99	
M2	1200	97	97
		98	
M5	150	97	97
		97	
M4	150	100	100
		100	
M3	150	93	93
		93	
O1	150	92	91
		91	
O3	150	90	93
		96	
O4	150	98	98
		98	
O2	240	95	97
		98	

Rendement extraction Pyra %	Moy
100	100
100	
100	100
100	
56	52
49	
99	100
100	
60	62
64	
- 32	- 13
7	
74	78
81	
80	80
80	
71	63
54	

Annexe 8 : Teneurs résiduelles en boscalid et en pyraclostrobine dans les épidermes de pommes (variété 2) après application des solutions de décontamination à base de supports adsorbants liquides filmogènes 24 heures après la contamination par Bellis

Echantillon	Boscalid (mg/kg de peaux)	Pyralostrobine (mg/kg de peaux)
P2+A1	1,1	8,4
P2+O1	1,4	11,0
P2+O3	1,4	10,9
P3+A1	1,3	8,3
O1	1,4	9,7
P1	1,6	9,5
O2	1,6	10,2
S1+S6-coating	nd	1,2
S1+S6-batch 15 min	nd	1,1
S1+S6 batch 1h	1,1	10,0
S3-coating	nd (0,23 en CPG/SM)	2,0 (0,47 en CPG/SM)
S3-S4 batch 15 min	nd	0,9
S3-S4 batch 1h	nd	2,0
S3+A2-coating	nd	0,8
S3+P5-coating	0,8	8,9
S3+A3-coating	2,1	9,2
S3+A3+A2-coating	2,4	10,5
P4-batch 15 min agitation latérale (sans pré-lavage à l'eau)	3,2	16,2
P4-batch 15 min agitation orbitale	nd	0,8
P4-batch 1h agitation orbitale	1,2	6,3
P4-batch 15 min agitation latérale	1,4	8,8
P4-batch 15min agitation orbitale	1,8	15,0
S1+M4-batch 15 min	1,3	8,6
S5-batch 15 min	2,8	13,9
S4-batch 15 min	2,2	11,6

Légende : nd non détecté (< 0,3 mg/kg)

Annexe 9 : Teneurs résiduelles en boscalid et en pyraclostrobine dans les épidermes de pommes (variété 2) après application des solutions de décontamination à base de supports adsorbants liquides filmogènes 10 jours après contamination par Bellis

Echantillon	Boscalid (mg/kg d'épiderme)	Pyraclostrobine (mg/kg d'épiderme)
S1+S6-batch 15 min	1,5	9,2
S1+S6-batch 1h	1,4	6,7
S4-batch 15 min	1,3	6,9
S4-batch 15 min	1,6	5,8
S4-batch 1h	1,4	7,7
S2-batch 15 min	1,6	8,5
S5-batch 1h	0,4 (0,8 en CPG/SM)	0,5 (nd en CPG/SM)
S5-batch 1h	1,4	7,7

Légende : nd non détecté (< 0,08 mg/kg)

Annexe 10 : Teneurs en chlorpyrifos-éthyl évaluées par CPG/DIF dans des épidermes de pomme Gala (Variété 1) contaminées par Pyrinex (0,5 g/L) avant et après décontamination par des agents filmogènes à base de gomme arabique

Echantillon	Lot	Réplicat	Chlorpyrifos (mg/kg d'épiderme)
Blanc matrice (10 pommes)	26/11/13	1	0,1
		2	0,1
Témoin contamination non lavé (10 pommes)	26/11/13	1	1,9
		2	1,7
Témoin contamination non lavé (2 pommes)	17/12/13	1	40,7
		2	9,4
Témoin H2O (2 pommes)	17/12/13	1	3,3
		2	36,3
S1 (4 pommes)	17/12/13	1	11,9
		2	31,8
S1+M4 (4 pommes)	17/12/13	1	4,7
		2	10,2
S1+M5 (4 pommes)	17/12/13	1	9,4
		2	11,2
S1+O4 (4 pommes)	17/12/13	1	4,7
		2	5,0

Annexe 11 : Taux d'extraction des résidus phytosanitaires dans les cires reconstituées des cuticules des pommes de la variété 2 par des systèmes organisés lipophiles (agents de vectorisation)

Vecteur	Spiking (mgP/kg cires)	%TA	TAUX D'EXTRACTION MOYEN (n=3) (%)				ET (n=3)			
			CHLOR	THIAM	FLU	BOS	CHLOR	THIAM	FLU	BOS
H2O	250	0	0	0	7	0	8	11	3	23
	500	0	5	58	64	23	12	21	22	11
	1250	0	0	62	87	20	5	0	0	1
	2500	0	0	71	90	29	3	2	1	1
E433	250	89	100	100	100	100	Le film de cires est dissout			
	250	33	97	74	100	100	0	3	0	0
	250	11	85	73	81	100	4	13	14	0
	250	1,75	56	70	71	88	3	7	7	5
	500	87	100	100	100	100	Le film de cires est dissout			
	500	12,5	98	87	100	100	0	1	0	0
	500	25	97	86	100	100	2	2	0	0
	500	3,62	61	70	83	89	3	3	1	4
	500	0,88	65	78	91	86	1	0	1	1
	1000	11,11	79	79	74	84	0	1	6	5
	1000	3,03	49	81	89	69	1	2	3	2
	1250	10	95	97	100	93	1	0	0	2
	1500	5,89	76	93	94	89	1	0	1	1
	2000	5,89	73	94	93	86	2	2	0	1
E473 (HLB 11,7) 10% glycérol	250	88,9	0	88	51	62	25	2	16	3
	250	44,4	15	29	55	76	4	0	3	1
	250	11,1	19	42	55	79	4	3	1	1
	500	87,5	0	54	66	82	4	2	5	4
	500	50	0	39	73	83	2	2	4	2
	500	12,5	0	13	39	72	27	8	15	2
E473 (HLB 8,3) 10% glycérol	1250	40	4	87	75	39	11	2	1	13
	250	88,9	16	63	53	55	6	13	2	9
	250	44,4	13	71	59	65	9	6	4	3
	250	11,1	20	45	41	4	2	4	24	68
	500	87,5	0	16	41	39	5	15	3	0
	500	50	6	76	53	50	1	8	0	3
E322	500	12,5	9	58	76	44	1	3	6	1
	1250	40	2	90	73	60	9	1	1	1
	250	20	52	32	58	83	4	5	6	9
	250	2,44	22	0	64	70	3	6	2	3
	250	0,39	27	0	61	8	4	6	2	6
	500	17,9	34	62	55	87	5	10	4	3
	500	3	12	42	73	61	1	3	2	4
	500	0,44	9	46	75	55	7	4	1	6
	750	7,27	0	17	26	10	8	8	4	5
	750	1,31	0	0	34	0	9	21	8	28
	1000	3,07	0	39	54	0	1	2	3	9
	1250	11,1	45	89	79	84	5	1	1	1
E471 10% EtOH	1250	2	5	82	86	47	5	1	1	6
	1750	5,95	12	66	59	9	7	7	0	10
	1750	1,56	11	72	68	6	2	1	8	1
	250	80	91	81	91	100	2	8	1	0
	250	44,4	59	71	82	98	6	2	2	2
	250	11,1	38	51	79	27	19	11	4	25
	500	87,5	64	89	99	100	1	0	0	0
500	50	64	89	99	100	6	2	0	0	
500	12,5	27	78	99	20	8	2	0	3	
1250	40	8	96	100	82	6	1	0	4	

Annexe 12 : Taux d'extraction du fludioxonil dans les épidermes de pommes de la variété 2 après décontamination en batch

Code essai	Résidus fludioxonil (mg/kg d'épidermes)	% extraction / ½ Réf	% extraction / Réf moyenne
½ MCT	0,088	52	65
½ Réf	0,170		
½ E475	0,130	26	48
½ Réf	0,175		
½ E476	0,165	43	34
½ Réf	0,287		
½ E477	0,096	69	62
½ Réf	0,306		
½ E491	0,104	65	58
½ Réf	0,298		
½ E492	0,111	43	56
½ Réf	0,196		
½ E493	0,142	46	43
½ Réf	0,265		
½ E495	0,116	54	54
½ Réf	0,251		
½ E1518	0,146	44	42
½ Réf	0,260		
½ Acétone	0,046	84	82
½ Réf	0,292		

Annexe 13 : Paramètres de solubilité de Hansen des molécules de phytosanitaires et d'additifs et des formulations

Substance	δ_D (MPa ^{1/2})	δ_P (MPa ^{1/2})	δ_H (MPa ^{1/2})	Rayon sphère de solubilité R0	Volume molaire (mL/mol)
Cires totales VAR2	15,82	6,91	8,37	11,4	nc
Acide oléanolique	18,57	3,08	8,67	9,6	315,6
Boscalid ^a	21,3	11,1	5,7	-	900,9
Captane ^a	20,4	6,6	4,1	-	665,4
Carbendazime ^a	20,3	13,5	10,1	-	484,0
Chlorpyrifos Et	16,58	8,35	7,32	12,3	808,3
Dithianon ^a	21,3	9,1	8,3	-	179,6
Flonicamid ^a	18,4	17,3	8,6	-	583,2
Fludioxonil ^a	20,0	10,0	7,9	-	1094,4
Propargite ^a	18,2	5,6	3,0	-	1011,7
Thiaclopride ^a	19,3	11,4	4,6	-	657,1
Thiamethoxam	18,01	14,41	9,12	9,8	668,5
Pirimicarbe ^a	18,8	12,3	12,3	-	713,2
Pyraclostrobin ^a	20,1	12,3	7,4	-	976,7
Eau ^b	15,8	16	42,3	-	18
Acétone ^b	15,5	10,4	7	-	73,8
Acétonitrile ^b	15,3	18	6,1	-	52,9
Acétate d'éthyle ^b	15,8	5,3	7,2	-	98,2
Ethanol ^b	15,8	8,8	19,4	-	58,4
E414	16,43	13,29	34,83	8,2	177777,8
E433	15,43	7,34	17,58	19,7	1224,3
E475	15,76	5,28	9,46	12,5	946,2
E476	16,87	5,38	5,42	10,9	>2800
E477	15,5	6,58	8,04	11,6	426,7
E491	17,8	2,07	6,7	10,7	430,7
E492	16,6	4,88	3,82	8,7	1036,1
E493	16,76	6,62	5,02	12,0	346,5
E495	15,79	7,02	8,24	11,4	403
E1518	15,61	9,84	10,5	13,7	188,2
MCT	15,5	6,58	8,04	11,6	534,5
E475-20%	15,49	12,99	33,25	-	20135,0
E476-20%	15,77	13,54	33,93	-	20651,7
E433-30%	15,48	13,40	34,88	-	379,9
E414-50%	15,97	14,65	38,57	-	88897,9
E491-20%	15,95	12,35	32,71	-	221,2
E492-20%	15,71	12,91	32,13	-	342,3
E493-20%	15,75	13,26	32,37	-	204,3
E495-20%	15,55	13,34	33,02	-	215,6
E477-20%	15,54	12,21	29,68	-	226,2
Duo	15,63	13,13	32,71	-	10188,5
Duo+	15,68	11,67	27,84	-	10285,4
ForA	15,537	7,96	9,98	-	465,0
ForB	15,51	7,03	12,04	-	693,8
ForC	15,58	12,39	28,11	-	163,4
ForD	15,5	8,49	7,52	-	304,2

Légende : ^a HSP calculés dans HSPiP v4.1.07, ^b HSP banque de données solvants, nc non calculé

Annexe 14 : Résultats des essais de décontamination des pommes de la variété 2 sur pilote
laboratoire

Contamination	Code essai	Teneurs moyennes en mg/kg de peaux VAR2 (n = 2)			
		Boscalid	Chlorpyrifos	Fludioxonil	Thiamethoxam
Aucune	Témoin	nd	nd	0,24	nd
24 heures	Référence H2O-24h	0,69	4,61	5,07	0,12
	Taq	1,52	7,52	9,96	0,12
	Taqac	1,39	8,80	10,81	0,13
	Tal	0,61	6,43	5,56	0,12
8 jours	Référence H2O-8j	3,04	7,73	13,33	0,32
	PC	1,47	6,49	8,04	0,19
	T33%-15	0,33	2,77	1,62	0,17
	T-PC	0,41	4,22	2,92	nd
	T12%-4	1,72	7,73	1,44	0,19
	T33%-4	1,39	7,20	9,56	0,20
8 jours	Teneurs dans le film de cire (mg/L solvant)				
	X	1,78	7,87	10,56	0,26

Légende : nd = non détecté (< 0,08 mg/Kg)

Conclusion générale et perspectives

De nos jours, tous les produits issus de l'agriculture non biologique reçoivent des traitements phytosanitaires plus ou moins importants selon l'espèce, la variété et les risques phytosanitaires encourus. Dans la majorité des cas, les molécules actives présentent des rémanences plus ou moins marquées et les teneurs résiduelles sont suivies avec beaucoup d'attention. L'enjeu en terme de santé publique mais également d'environnement a motivé de nombreux pays vers une demande commerciale et éthique tendant vers le zéro résidu détectable. Les pommes font partie des fruits les plus consommés dans le monde mais aussi les plus traités.

Ces travaux s'inscrivent dans le cadre du FUI AAP13 - INNO'POM – AGRIMIP 2012 (2012-2016) dont les principaux objectifs sont :

- développer une offre produits capable de satisfaire les exigences du marché les plus fortes, quant à la présence de résidus de produits phytosanitaires,
- produire des pommes de qualité sanitaire supérieure, sans résidus de produits phytosanitaires détectables, de manière intensive hors de la filière de culture biologique, et compétitive sur le marché européen.

Peut-on vraiment produire des pommes avec « zéro résidu » détectable tout en maintenant le même niveau de production et la même fréquence de traitement ? Douze résidus phytosanitaires (boscalid, captane, carbendazime (autorisée en tant que métabolite du thiophanate méthyl), chlorpyrifos-éthyl, dithianon, flonicamide, fludioxonil, pirimicarbe, propargite (interdite après le démarrage du FUI), thiaclopride, thiamethoxam, pyraclostrobine) ont été suivis au cours de ce projet sur trois variétés de pommes (Gala, Fuji et Pink Lady) récoltées en Midi-Pyrénées, dans le Sud-Ouest de la France. La détection de ces molécules dans les peaux des trois variétés s'explique par :

- le traitement direct des variétés avant la récolte (cahiers de culture),
- les contaminations croisées lors du traitement des variétés voisines (cahiers de culture différents selon les variétés et les risques encourus) ou par contact avec des pallox contaminés ou des bains contaminés en station fruitière,
- les rémanences de certaines molécules (détection de propargite interdite officiellement à partir de décembre 2011).

L'étude de l'état de l'art a soulevé de nombreuses interrogations scientifiques auxquelles nous avons tenté de répondre pour atteindre par voie chimique l'objectif de « zéro résidu » détectable.

 *Comment se structure l'épiderme des pommes ? Quel est le rôle des composants majoritaires de la cuticule, c'est-à-dire des cires cuticulaires dont les acides triterpéniques, et de la cutine ?*

Les épidermes des trois variétés de pommes étudiées représentent environ 10 % de la masse du fruit frais. Les teneurs en lipides des épidermes sont légèrement différentes, entre 11,8 et 14,7 %, de la Gala à la Pink Lady®. En particulier, la teneur en cires cuticulaires est plus importante dans l'épiderme de la Pink Lady® (1,3 mg/cm²) que dans l'épiderme des deux autres variétés (0,9 mg/cm²). Les cires sont constituées essentiellement de trois triterpénoïdes pentacycliques identifiés (acides oléanolique, ursolique et uvaol), d'alcane linéaires à longues chaînes (C27 et C29) et d'esters.

D'autres composés non identifiés à hauteur de 30 % dans les cires sont également présents parmi lesquels des alcools gras secondaires, des acides gras, des diols et des cétones. Les esters représentent environ 21 % des cires cuticulaires totales des trois variétés de pommes. La teneur en uvaol est relativement stable autour de 4% pour les trois variétés. Les cires de la Gala sont plus riches en alcanes (13,9 %) que celles des deux autres variétés (environ 7 %), tandis que la teneur en acides triterpéniques est plus élevée dans les cires de Pink Lady® (39 %) que dans les cires de Fuji (37 %) mais surtout dans les cires de Gala (25 %). **Ces particularités expliquent les différences de mouillabilité de la surface des épidermes d'une variété à l'autre.** Les alcanes participent au caractère cristallin des cires et augmente le caractère hydrophobe de la surface tandis que les acides triterpéniques participent à une phase amorphe et confère un caractère beaucoup moins hydrophobe. **De plus, la morphologie de la surface des épidermes des trois variétés de pommes est liée à la composition chimique des cires.** La surface des pommes Gala est caractérisée par une mouillabilité faible (angle de goutte 104°) et une organisation des cires à la fois dans le sens longitudinal de l'épiderme et transversal (cristaux perpendiculaires à la surface). La surface des pommes Pink Lady® est caractérisée par une mouillabilité beaucoup plus élevée (angle de goutte 81°) et peut être considérée comme plus hydrophile que celle de la Gala. La surface est caractérisée par une distribution des cires dans le sens longitudinal, sans relief. La surface des Fuji présente des caractéristiques « intermédiaires » entre celles de la Gala et celles de la Pink Lady®. Elle est caractérisée par une mouillabilité plus élevée mais le caractère reste hydrophobe (angle de goutte 94°). La surface présente beaucoup moins de structures dans le sens transversal.

La répartition des lipides cuticulaires ne varie pas significativement d'une variété à l'autre : pour chacune d'elle, les cires représentent environ 40 %, la cutine 47 % et le cutane 6 %. Par conséquent, les caractéristiques structurales des cuticules des trois variétés sont identiques : **79 % de la structure est de nature amorphe (amorphe solide, de mobilité intermédiaire à très mobile) et 21 % de nature cristalline. Les cires sont les seules à présenter des structures cristallines, en plus de structures amorphes solides et de mobilité intermédiaire.** La cuticule décirée, qui correspond à 80 % de cutine et 8-12 % de cutane est totalement amorphe, avec des structures amorphes solides mais également très mobiles. Les cuticules sont donc des biopolymères semi-cristallins présentant des structures amorphes.

L'interconnexion de la cutine avec les cires et par conséquent la complexité de la structure du réseau amorphe/cristallin a été en partie élucidée. **Cette complexité représente la tortuosité du chemin de diffusion apolaire pour les molécules non ioniques telles que l'eau, les liquides en général (solvants) ou des solutés hydrophobes telles que les molécules phytosanitaires, jusqu'à une masse molaire d'environ 3000 Da.** Cette exclusion de taille est spécifique à une espèce végétale, mais *quid* des variétés d'une même espèce ? Si le ratio amorphe/cristallin de la cuticule est représentatif de la tortuosité du chemin de diffusion, étant identique (8:2) dans le cas des trois variétés de pommes étudiées, il peut être conclu que la pénétration des molécules extérieures ne sera pas discriminée par la variété de l'espèce *Malus domestica*. En revanche, étant donné que **la composition des cires est différente**, il est probable que **des différences pourront être observées d'une variété à l'autre, en fonction des interactions entre les composés de la matrice et les molécules extérieures pénétrant la cuticule des pommes.** Ces différences pourront influencer sur les cinétiques de diffusion.

Les évaluations auxquelles nous avons procédé confirment que la cuticule peut être représentée par un **réseau tridimensionnel, totalement inhomogène** dont la surface est protégée par la

superposition de cires épicuticulaires pouvant s'organiser soit parallèlement à la surface, soit perpendiculairement, soit dans les deux directions. L'épaisseur de la cuticule à partir de laquelle les cires viennent imprégner le polymère de cutine n'a pas pu être précisée, pas plus que leur répartition. Cependant, il est évident que celle-ci n'est pas homogène. Cela contribue à l'inhomogénéité de la structure globale de la cuticule. La pénétration des molécules extérieures sera directement affectée et nous avons observé qu'une des conséquences majeures était **l'inhomogénéité de répartition des résidus phytosanitaires dans les épidermes.**

 Où la molécule de phytosanitaire se loge-t-elle une fois qu'elle a pénétré la cuticule ? Quelles sont les interactions entre les composés de la matrice et les molécules phytosanitaires à la base de la rétention ?

Le **fludioxonil a été utilisé comme molécule modèle pour étudier la mobilité des contaminants hydrophobes dans les cuticules et ses différents lipides (cires, cutine/cutane) des épidermes de pommes Fuji.** Les analyses par RMN du fludioxonil étalon chimique et du fludioxonil formulé dans le produit de traitement Geoxe ont mis en évidence que l'étalon se comporte comme une molécule rigide et l'introduction d'additifs dans la formulation génère une modification de l'environnement chimique du fludioxonil, qui se traduit par un gain d'environ 10 % de mobilité. Une fois dans la cuticule, la mobilité du fludioxonil/Geoxe est très nettement améliorée : 100 % du fludioxonil devient mobile. Nous avons mis en évidence que le fludioxonil se trouve dans deux environnements distincts de la cuticule, **(i) majoritairement dans un environnement dans lequel sa mobilité est importante et (ii) minoritairement dans un environnement dans lequel cette dernière est plus modérée.** Nous avons émis les hypothèses suivantes : dans son environnement le plus mobile, le fludioxonil pourrait *(i)* soit être solvato par d'autres molécules du milieu, *(ii)* soit se trouver dans une zone très mobile voire liquide de la cuticule, *(iii)* soit se localiser dans un pore (espaces intercellulaires vides). **Ce fludioxonil est supposé être en interaction avec la cutine.** Dans son autre environnement, la mobilité semble affectée par une interaction du fludioxonil plus importante que celle qu'il pourrait avoir avec la cutine.

En parallèle, nous avons observé que lors de l'analyse par CPG/SM² des résidus de phytosanitaires dans des extraits QuEChERS d'épiderme des pommes, les molécules de phytosanitaires subissent des effets matrice négatifs, *i.e.* la présence d'analytes co-extraits de l'épiderme entraîne une suppression du signal des phytosanitaires. L'importance de ces effets ne semble pas dépendre de la variété des pommes mais elle est liée à la nature des molécules de phytosanitaires : le boscalid et le fludioxonil sont plus affectés que le chlorpyrifos, le pirimicarbe, la propargite ou le flonicamid. Nous avons mis en évidence que la présence en quantité importante d'acides triterpéniques dans les extraits QuEChERS d'épiderme, par comparaison aux extraits de chair et de fruit entier, entraîne des effets matrice négatifs d'autant plus importants que les molécules de phytosanitaires présentent un caractère basique (présence de groupements azotés, présence et nature de substituants halogénés) et/ou sont difficilement vaporisables dans l'injecteur split/splitless du chromatographe en phase gazeuse (températures d'ébullition élevées). Notons que les acides triterpéniques sont susceptibles d'intervenir dans d'autres interactions au sein de la cuticule, et notamment avec les esters des cires, pour lesquels nous avons observé un déplacement de la bande caractéristique C=O en IR en présence des acides triterpéniques.

Nous avons émis l'hypothèse que, **dans son environnement le moins mobile, le fludioxonil pouvait être en interaction forte avec les acides triterpéniques des cires cuticulaires.**

 *Comment faire pénétrer un agent chimique d'extraction dans l'épiderme ? Comment le faire interagir avec la molécule phytosanitaire ? Comment extraire ensuite le complexe agent – phytosanitaire ? Avec quels outils peut-on modéliser les phénomènes de transport de matière depuis l'extérieur vers la cuticule et inversement ?*

En d'autres termes, quelles propriétés ou caractéristiques physico-chimiques doit présenter l'agent pour pénétrer puis le complexe phytosanitaire – agent pour s'extraire de la cuticule ou être extrait ?

Nous avons précédemment évoqué le fait que les résidus phytosanitaires ne sont pas uniformément répartis dans le volume de l'épiderme. De plus, leur pénétration est dépendante de leurs caractéristiques physico-chimiques et de leur affinité avec la cuticule. **Ces deux paramètres, inhomogénéité de répartition et vitesses de pénétration variables, complexifient l'extraction totale des résidus.**

Si nous supposons que les molécules hydrophobes participent à différentes interactions avec la cuticule (cires et cutine), à l'instar du fludioxonil dans les cuticules de pommes Fuji, il est important d'identifier les **différentes interfaces initialement en jeu** : (phytosanitaires – cires), (phytosanitaires – cutine), (agent de décontamination – cires) et (agent – cutine) **puis celles survenant au cours de la décontamination** : (phytosanitaires – agent). Nous avons évalué les paramètres de solubilité des différentes molécules entrant en jeu afin de **déterminer les conditions expérimentales pour lesquelles les échanges de matière cuticule – phytosanitaires – agent de décontamination sont optimaux**. Les agents de décontamination doivent pouvoir se sorber et diffuser dans la cuticule au même titre que les molécules hydrophobes de phytosanitaires. Ils doivent donc se solubiliser à l'interface des cires pour être transportés dans la cuticule. **Plus l'affinité entre l'agent et les cires et la cutine est élevée, plus la pénétration est favorisée**. Par la suite, les agents doivent établir des interactions avec les phytosanitaires plus importantes que celles existant entre les phytosanitaires et la cuticule. **Ils doivent pouvoir solvater les molécules de phytosanitaires**. Nous avons observé que **l'élimination du complexe phytosanitaires – agent est une étape clé pour l'élimination des contaminants hydrophobes dans la cuticule**.

 *Quelle stratégie (agents chimiques, outils, méthodologie) peut-on mettre en œuvre pour identifier et développer un procédé à l'échelle industrielle à l'issue duquel il sera possible d'extraire les résidus phytosanitaires des pommes afin de proposer un fruit « zéro résidu » détectable ?*

Nous avons sélectionné des agents présentant les propriétés nécessaires pour pénétrer la cuticule et créer des interactions avec les molécules de phytosanitaires. Trois d'entre eux génèrent une augmentation significative de la mobilité du fludioxonil dans ses deux environnements, tandis que les autres agents mobilisent plus ou moins le fludioxonil dans son environnement le plus mobile uniquement. Ceci laisse supposer que ces derniers ne pourront pas être mis en œuvre dans un objectif de « zéro résidu » détectable. Dans tous les cas, plus la durée de la diffusion augmente (temps de contact cuticule – agent), plus le taux d'extraction augmente. **L'extraction des résidus, en plus d'être concentration-dépendante (quantité suffisante d'agent pour créer le gradient de diffusion à travers la cuticule et séquestrer le plus de molécules phytosanitaires), est également temps-dépendante.**

Nous avons mis en œuvre ces trois agents pour la décontamination de pommes Fuji sur un pilote préindustriel et avons effectué une série d'essais. Chaque étape du procédé de décontamination a été scrupuleusement étudiée : mise en contact des agents (vaporisation, bains), utilisation de brosses, élimination du complexe phytosanitaires – agent, de même que les caractéristiques des agents (concentrations, formulations) et le paramètre clé de l'efficacité : la durée des traitements.

L'ensemble de nos travaux a permis de compléter les connaissances actuelles sur la caractérisation, la structure et les interactions entre l'épiderme et des contaminants à caractère hydrophobe, et plus spécifiquement les molécules phytosanitaires.

L'objectif d'une pomme zéro résidu détectable a été atteint. Le procédé à mettre en œuvre repose sur la création d'un gradient de diffusion dans la cuticule des fruits à partir de plastifiants appliqués successivement en série. La durée des différentes étapes de traitement est un paramètre clé de l'efficacité globale d'extraction des résidus.

De nombreux autres travaux peuvent être d'ores et déjà envisagés, à commencer par une validation de la qualité organoleptique des pommes en terme de conservation physiologique et sanitaire après le traitement infligé, qui n'a pas pu être abordée ici.

Afin d'évaluer les différents coefficients de diffusion des molécules ainsi que la tortuosité du chemin de diffusion de la cuticule, des essais de faisabilité de transport des molécules de phytosanitaires à travers des cuticules isolées à partir des épidermes de pommes dans des cellules de diffusion ont été initiés. Il nous paraît fondamental de poursuivre ces investigations qui apporteront des informations de premier ordre dans le cadre de l'acquisition de modèles de connaissance et de simulation (*i*) de systèmes réactionnels à l'équilibre ou à la cinétique contrôlée aux échelles macroscopiques et microscopiques dans des milieux biologiques et alimentaires, et (*iii*) des équilibres entre phases (solide, liquide, vapeur).

Au cours de nos travaux, il est apparu nécessaire de faire progresser les connaissances pour une représentation structurale de l'épiderme des pommes, et en particulier de la cuticule, au plus proche de la réalité, permettant ainsi une meilleure compréhension des phénomènes de transport et de rétention. Il serait intéressant de poursuivre l'étude de l'ultrastructure de la cuticule avec la plateforme synchrotron SOLEIL (Saclay, France).