

Rencontres
scientifiques
de
l'Anses

anses
agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



Santé des abeilles : la surveillance aujourd'hui, les perspectives pour demain

09

décembre 2014

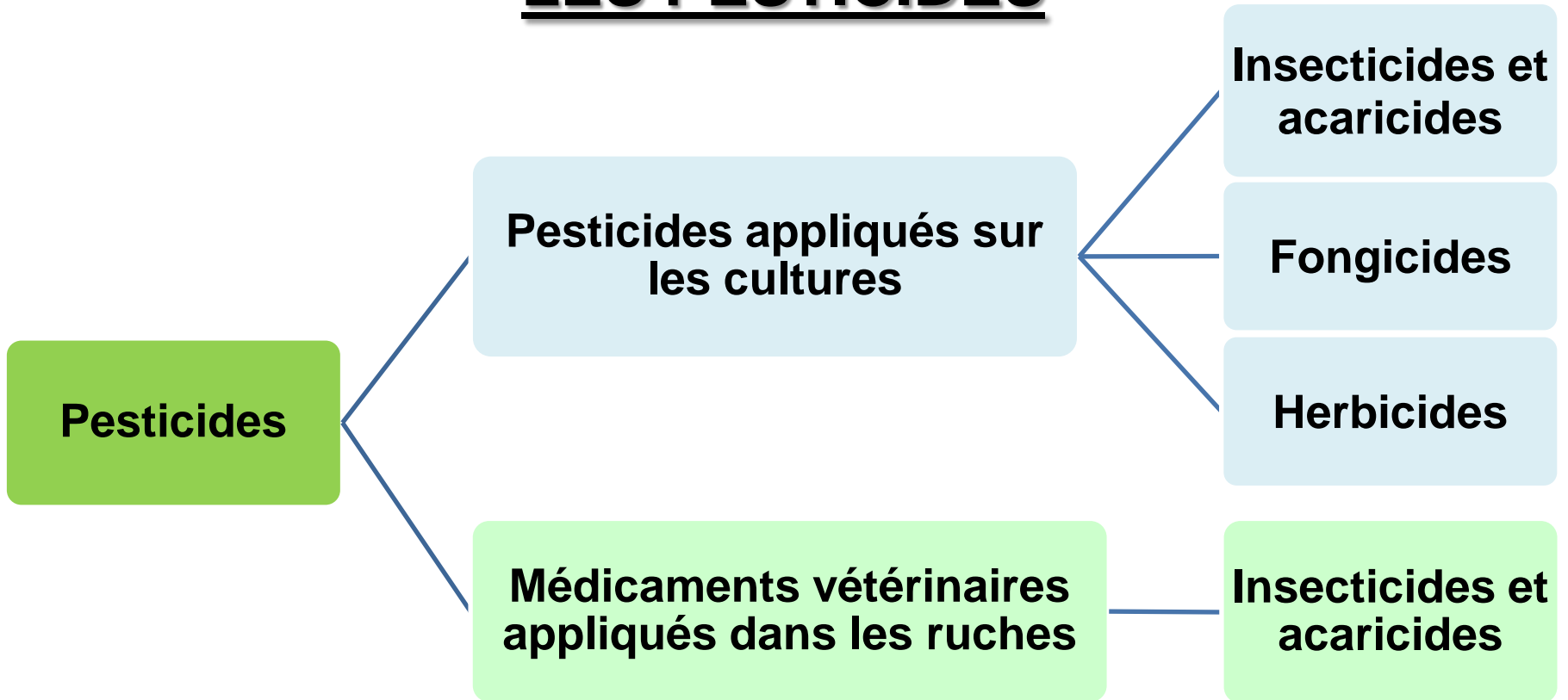
Maison internationale
Cité internationale universitaire de Paris

Abeilles et résidus de pesticides : méthodologie analytique

Anne-Claire Martel

Anses - Laboratoire de Sophia Antipolis

LES PESTICIDES



Informations sur :

1) Les caractéristiques physico-chimiques et toxicologiques :

- <http://www.agritox.anses.fr/php/fiches.php>
- <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/atoz.htm>

2) La liste des produits phytosanitaires et leurs usages en France :

- [Index phytosanitaire \(ACTA\)](#)
- <http://e-phy.agriculture.gouv.fr/>

POURQUOI RETROUVE-T-ON DES RÉSIDUS DANS LES ÉCHANTILLONS ?

Pesticides dans l'environnement

↳ Végétaux
Sol
Eau
Air



↳ Abeilles
Nectar
Pollen
Eau

Pesticides dans les ruches (pour lutter contre les parasites)

↳ Ruche

↳ Abeilles
Larves
Pain d'abeilles
Miel
Cire
Gelée royale

CAS DE MORTALITÉS DES ABEILLES

MÉTHODOLOGIE

● **Collecte des données et des échantillons :**

- Commémoratifs
- Traitements phytosanitaires et médicamenteux (cahier d'élevage)
- Quantité échantillon
- Transport échantillons

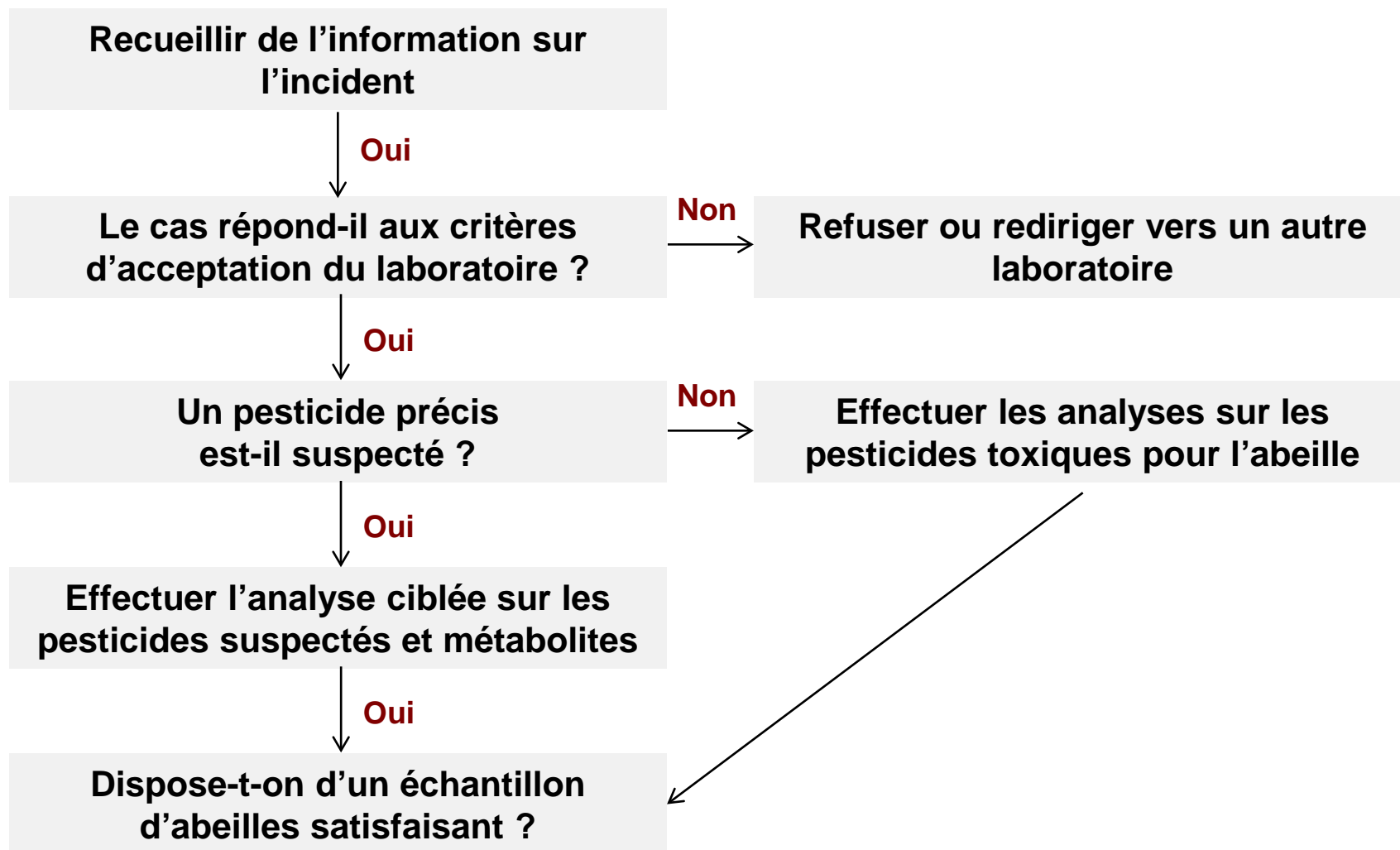
● **Analyse des prélèvements :**

- Extraction, purification, dosage
- Analyse ciblée

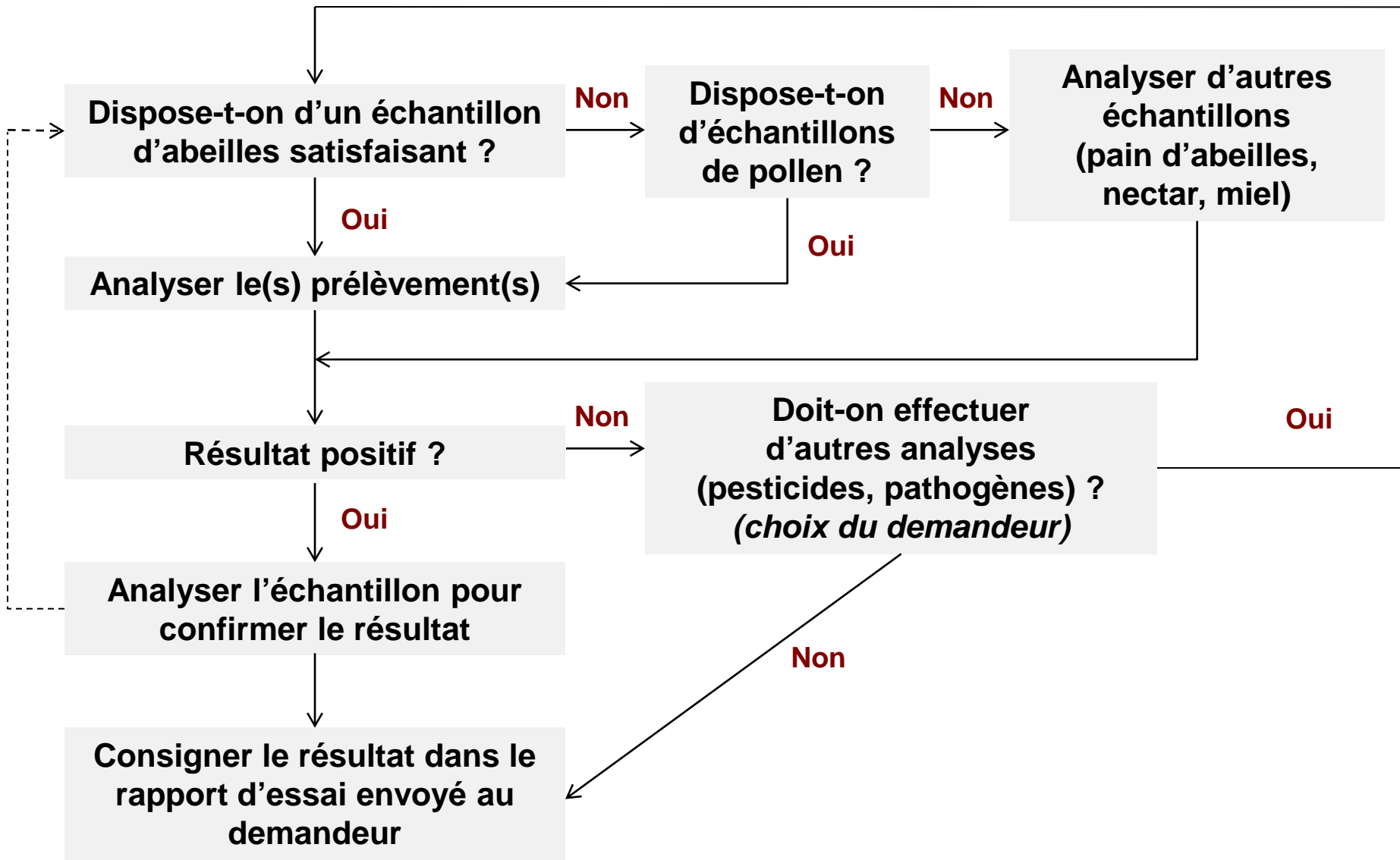
● **Interprétation des résultats :**

- Difficile d'évaluer précisément la dose ou la durée de l'exposition du fait des délais imprécis entre l'incident et la collecte des échantillons.

EXEMPLE DE DIAGRAMME DE PROCESSUS D'ANALYSE DE RÉSIDUS



EXEMPLE DE DIAGRAMME DE PROCESSUS D'ANALYSE DE RÉSIDUS



MÉTHODE D'ANALYSE

PRINCIPE

- **Résidus de pesticides :**

- Les produits recherchés sont les matières actives elles-mêmes et/ou leurs produits de dégradation (métabolites).
- Ces produits sont présents à l'état de traces dans les matrices et nécessitent des techniques analytiques très performantes.

- **Analyse :**

- Le but de la recherche de résidus est de séparer la molécule à doser de l'ensemble des composants de la matrice puis de la quantifier.



Atteindre des seuils toxicologiques pour l'abeille.

TOXICITÉ DES PESTICIDES VIS-À-VIS DES ABEILLES

Toxicité par contact	+	DL50 < 2 µg/abeille (produit fortement toxique)
	↑	2 µg/abeille < DL50 < 11 µg/abeille (produit modérément toxique)
	—	DL50 > 11 µg/abeille (produit pratiquement inoffensif)
Toxicité orale	+	DL50 < 1 µg/abeille (produit fortement toxique)
	↑	1 µg/abeille < DL50 < 10 µg/abeille (produit modérément toxique)
	↑	10 µg/abeille < DL50 < 100 µg/abeille (produit légèrement à peu toxique)
	—	DL50 > 100 µg/abeille (produit inoffensif)

Source : http://www.epa.gov/oppefed1/ecorisk_ders/toera_analysis_eco.htm#HDEUED
<http://www.epa.gov/espp/litstatus/effects/redleg-frog/2010/permethrin/appendix-f2.pdf>

AVANT L'ANALYSE

- **Familles chimiques** (néonicotinoïdes, organochlorés, organophosphorés, pyréthriinoïdes, carbamates)
- **Caractéristiques physico-chimiques :**
 - Solubilité
 - Stabilité chimique (dans les solvants, pH)
 - Stabilité thermique
- **Nature de l'échantillon :** nombreuses matrices
- **Protocole analytique :** méthodes mono-résidu ou multi-résidus

MATRICES APICOLES

LEUR COMPOSITION

Matrices : complexes et diversifiées.

- **Abeilles** : forte teneur en matières grasses et pigments.



- **Pollen** : composé principalement de sucres et de protéines. Présence de pigments.



- **Miel** : forte teneur en sucres. Diverses origines florales.



- **Pain d'abeilles** : mélange de pollen et de miel.

- **Nectar** : forte teneur en eau et sucres.

- **Cire** : très forte teneur en matières grasses. Présence de pigments.



PROCÉDURE ANALYTIQUE

DESCRIPTION

● Étape 1 : Échantillonnage et aliquotage

- Étape importante impactant l'analyse.
- La qualité des conditions de prélèvement et de transport (chaîne du froid) joue sur celle de l'échantillon donc sur le résultat final.
- Au laboratoire, pour obtenir une fraction représentative de l'échantillon, celui-ci est homogénéisé par broyage.
- Une aliquote est ensuite faite pour l'analyse des résidus de pesticides : la prise d'essai.

PROCÉDURE ANALYTIQUE

DESCRIPTION

● Étape 2 : Extraction

- **Objectif** : extraire au mieux la molécule de la matrice avec un minimum de composés interférents.
- Consiste à mettre la matrice en contact avec un solvant afin de favoriser le passage de la molécule dans celui-ci.
- **Choix du solvant est primordial** : de l'eau à l'hexane apolaire en passant par le méthanol, l'acétone, l'acétonitrile de polarités intermédiaires.

ÉQUIPEMENT UTILISÉ POUR L'EXTRACTION

- Homogénéisation :

Tube Drive



Ultra-turrax



- Cuve ultrasons

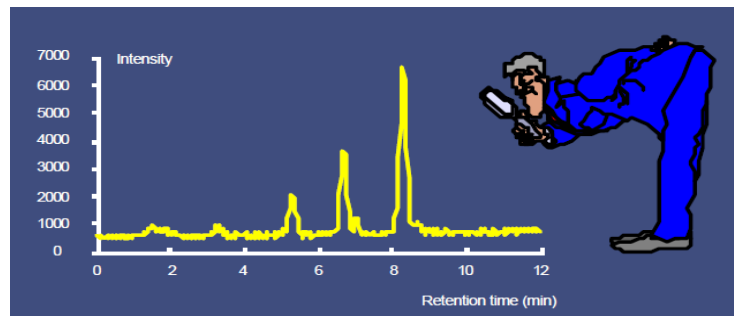
- Mini-extracteurs : ASE (extraction accélérée par solvants)

PROCÉDURE ANALYTIQUE

DESCRIPTION

● Étape 3 : Purification

- **Objectif** : séparer les molécules recherchées des impuretés amenées par la matrice.
- Afin d'éviter lors de la détection d'avoir des interférences et des chromatogrammes difficilement exploitables (problème de faux positifs).



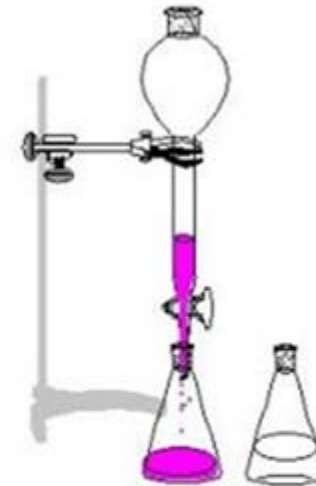
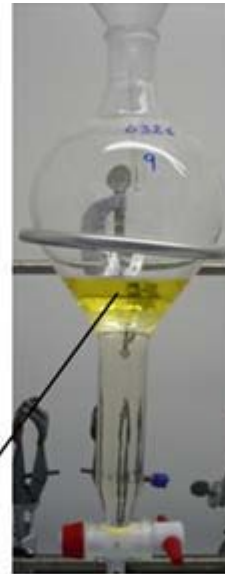
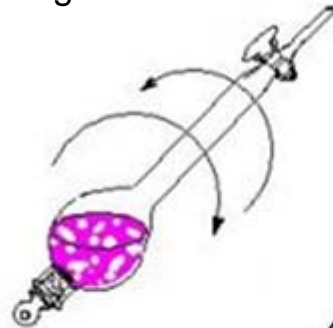
PURIFICATION

PAR SÉPARATION LIQUIDE/LIQUIDE

Transfert de l'extrait dans une ampoule à décanter et ajout d'un solvant organique non miscible



Agitation



Récupération de la phase contenant les résidus de pesticides puis évaporation de l'extrait

Après décantation, obtention de 2 phases

PURIFICATION

PAR EXTRACTION SOLIDE/LIQUIDE

**Deux possibilités
pour éliminer les composés interférents**

Cartouche SPE

Conditionnement



Dépôt de l'échantillon



Analyte

Impuretés

Élution



Composés d'intérêt
sont élués et évaporés

Extrait est filtré et analysé en chromatographie

SPE dispersive



Trois types de mélanges de poudres :

- PSA, MgSO₄
- PSA, MgSO₄, C₁₈, GCB
- PSA, MgSO₄, GCB

Approche Quechers

(Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe)

PROCÉDURE ANALYTIQUE

DESCRIPTION

● Étape 4 : Dosage chromatographique

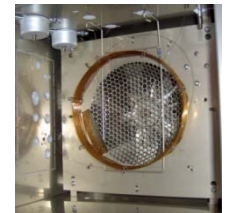
➤ Chromatographie liquide utilisée pour l'analyse des :

- ✓ Pesticides polaires
- ✓ Substances non volatiles
- ✓ Composés thermolabiles
- ✓ Néonicotinoïdes, organophosphorés



➤ Chromatographie gazeuse utilisée pour l'analyse des :

- ✓ Composés apolaires ou moyennement polaires
- ✓ Substances volatiles
- ✓ Composés stables à haute température
- ✓ Organochlorés, pyréthriinoïdes, organophosphorés



➤ Couplage de la chromatographie avec la spectrométrie de masse (LC-MS/MS et GC-MS/MS) est une combinaison permettant d'identifier un analyte dans un échantillon.

PROCÉDURE ANALYTIQUE

DESCRIPTION

● Étape 4 : Dosage chromatographique

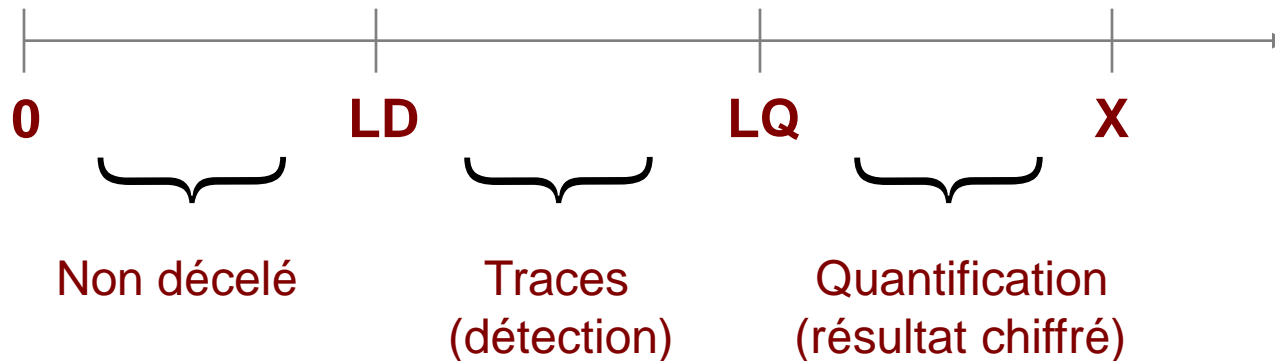
- Tester l'effet matrice : interférences (co-élutions) ou altération du signal (augmentation ou suppression du signal).
- Utiliser un étalon interne d'extraction pour contrôler le mode opératoire : étalon ajouté à la prise d'essai avant de commencer l'analyse de l'échantillon.
- Utiliser des matériaux de référence certifiés ou des matrices témoins supplémentées au laboratoire.
- Valider la méthode d'analyse

PROCÉDURE DE VALIDATION

- **Document SANCO/12571/2013** : Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed.
 - ✓ 2 niveaux de supplémentation (LQ et autre niveau)
 - ✓ 5 répétitions par niveau de supplémentation
 - ✓ 3 séries d'analyses
- **Norme française** : *Analyse des produits agricoles et alimentaires* : protocole de caractérisation en vue de la validation d'une méthode d'analyse quantitative par construction du profil d'exactitude, **Norme AFNOR V03-110** (Mai 2010).
 - ✓ 3 niveaux de supplémentation (LQ et deux autres niveaux)
 - ✓ 3 répétitions par niveau de supplémentation
 - ✓ 5 séries d'analyses
- **Rendements d'extraction doivent être compris ente 70-120%, avec un coefficient de variation (CV) de 20%.**
- **Détermination des limites de détection (LD) et de quantification (LQ).**

ANALYSES QUANTITATIVES

- Définir les critères d'acceptabilité de la séquence analytique.
- Résultats exprimés :
 - en mg/kg
 - en $\mu\text{g}/\text{kg}$
 - en ng/abeille (1 abeille = 0,1 g)



CONCLUSION

- **Analyse longue et délicate :**
 - Extraction de traces
 - Matrices complexes
 - Utilisation de solvants et réactifs purs
- **Différentes molécules à détecter :**
 - Méthodes mono-résidu et multirésidus
- **Augmenter la sensibilité des détecteurs :**
 - Nécessité d'utiliser des appareils perfectionnés, plus sensibles.
- **Harmonisation, interprétation des résultats :**
 - Utiliser une méthode de référence, travailler sous assurance qualité (accréditation), participer à des essais inter-laboratoires.

CONCLUSION

- **Les acteurs de terrain :**

- Choix de l'échantillon
- Modalités d'échantillonnage
- Informations sur le(s) prélèvement(s)
- Transport - Stockage

- **La communication entre les différents acteurs pour l'interprétation des résultats :**

- Laboratoire
- Services vétérinaires et de la protection des végétaux
- Professionnels (apiculteurs, agriculteurs)



Merci pour votre attention

Contact :

Tél : 04 92 94 37 00 - Fax : 04 92 94 37 01

Email : anne-claire.martel@anses.fr