

Revue générale

Difficultés analytiques de la caractérisation des pesticides dans le sang

Analytical difficulties in the characterization of pesticides in blood

Jean-Pierre Anger^{1*}, Pascal Kintz²

¹ Université de Rennes 1, 35043 Rennes Cedex, France

² Laboratoire CHEMTOX, 3 Rue Grüninger, 67400 Illkirch, France

Résumé – Objectifs : Malgré les incontestables services qu'ils ont pu rendre à l'agriculture, l'utilisation des pesticides n'est pas sans danger pour l'homme. En dehors des intoxications aiguës accidentelles ou volontaires, l'exposition répétée à ces produits ou la consommation d'aliments contaminés par leurs résidus peuvent être à l'origine de divers troubles pour la santé humaine : perturbations endocriniennes, dérèglement du système immunitaire, apparition de certains types de cancers, troubles de la reproduction, etc. Il importe donc de pouvoir les caractériser ou surveiller leur présence dans les milieux biologiques. L'objet de ce travail est de recenser les moyens analytiques modernes qui permettent de doser les pesticides dans le sang, milieu biologique facilement accessible et de composition constante et d'insister sur les difficultés analytiques rencontrées lors du choix de la méthode et de l'interprétation des résultats. **Méthodes :** De très nombreuses techniques analytiques sont proposées aujourd'hui pour l'analyse des pesticides et/ou leurs métabolites dans les milieux biologiques. Après traitement de l'échantillon, le plus souvent par micro-extraction en phase solide (SPME), l'analyse instrumentale proprement dite fait appel aux méthodes chromatographiques classiques comme la chromatographie en phase gazeuse (GC) ou la chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplées toutes deux à la spectrométrie de masse simple (MS) ou en tandem (MS/MS). Certaines méthodes permettent la caractérisation de plusieurs pesticides appartenant à des familles différentes, mais elles restent rares. La plupart des techniques se limitent à doser un groupe donné de pesticides dans des conditions expérimentales bien précises. **Résultats :** La mise en évidence des pesticides dans le sang requiert des techniques sophistiquées nécessitant un matériel souvent onéreux et des techniciens expérimentés. Les concentrations toxiques sont très variables d'un composé à l'autre et justifient la recherche d'une limite de quantification (LOQ) parfois très faible. L'obtention d'étalons de référence purs peut également être source de difficultés sans compter qu'il n'existe pas de méthode officielle recommandée. L'interprétation des résultats constitue sans doute le problème majeur car la toxicocinétique des pesticides est généralement mal connue et difficile à établir chez l'homme. **Conclusions et perspectives :** Il n'existe pas aujourd'hui de méthode universelle de dosage des pesticides dans le sang. La mise en place d'une méthodologie donnée requiert une demande bien précise de la part du clinicien. L'interprétation des résultats reste parfois difficile. Il apparaît donc évident que le développement d'un screening général de recherche des pesticides comme il en existe un actuellement pour les médicaments, puisse voir le jour afin de raccourcir le délai de réponse du laboratoire au clinicien. L'immunochimie apportera peut-être la solution.

Mots clés : Pesticide, environnement

Abstract – Objectives: Despite the undoubted services which they could return in agriculture, the use of pesticides is not safe for humans. Apart from acute accidental or deliberate, repeated exposure to such products or consumption of food contaminated by their residues can be at the origin of various health troubles for the human: endocrine disturbances, disruption of the immune system, appearance of certain types of cancer, reproductive disorders, etc. It is therefore important to characterize or monitor their presence in biological materials. The purpose of this work is to identify ways that allow modern analytical measurement of pesticides in blood, biological environment and easily accessible composition and to insist on the analytical difficulties encountered in selecting the method and the interpretation of results. **Methods:** Many analytical techniques are available now for analysis of pesticides and/or their metabolites in biological environments. After processing the sample, usually by micro-solid phase extraction (SPME), the instrumental analysis itself uses conventional chromatographic methods such as gas chromatography (GC) or high performance

* Correspondance : Jean-Pierre Anger, Tél. 02 99 68 92 39, jean-pierre.anger@wanadoo.fr

liquid chromatography (HPLC) both coupled with mass spectrometry simple (MS) or tandem (MS/MS). Some methods allow characterization of several pesticides belonging to different families, but they remain rare. Most of the techniques is limited to assay a group of pesticides in specific experimental conditions. **Results:** The identification of pesticides in the blood needs sophisticated techniques often requiring expensive equipment and experienced technicians. The toxic concentrations vary widely from one compound to another and justify the search for a limit of quantification (LOQ) sometimes very low. Obtaining pure standard reference could also cause difficulties in addition there is no official method recommended. The interpretation of results doubtless constitutes the major problem because the toxicokinetics of pesticides is generally poorly understood and difficult to establish in humans. **Conclusions and prospects:** There is currently no universal method for determination of pesticides in the blood. The establishment of a given methodology application requires a specific demand of the clinician. The interpretation of the results remains sometimes difficult. It is therefore obvious that the development of a general research screening of pesticides as it currently exists for medicines and drugs, could see the day to shorten the response time from the laboratory to the clinician. The immunochemistry will bring, maybe, the solution.

Key words: Pesticide, environment

Cet article fait suite à une communication orale présentée au Congrès mixte international SFTA-SMTCA-STC (Essaouira, Maroc, 16-18 octobre 2008)

Reçu le 3 février 2009, accepté après modifications le 3 avril 2009

Publication en ligne le 3 juin 2009

1 Introduction

Par définition les pesticides ou produits phytosanitaires sont des substances destinées à éliminer les ennemis des cultures et des récoltes. Sous ce vocable, on trouve un grand nombre de produits tels les insecticides, les herbicides, les fongicides, les raticides pour ne citer que les principaux groupes. Leur utilisation commence réellement dans les années 50. Plus de mille ingrédients actifs ont été employés, formulés en plusieurs milliers de produits commerciaux différents et utilisés à travers le monde par des millions de travailleurs dans des domaines divers comme l'industrie, l'agriculture et même la santé publique [1]. L'utilisation des pesticides a fourni certes des avantages incontestables en augmentant les productions agricoles, mais tous ces agents chimiques pour la plupart ne sont pas totalement spécifiques vis-à-vis des organes cibles à détruire et leur présence ubiquitaire dans l'environnement peut mettre en danger d'autres espèces vivantes dont l'homme soit directement lors de leur application, soit par suite de la consommation d'aliments où ils persistent à l'état de résidus. Les pesticides font donc partie des substances susceptibles d'occasionner des risques à la fois pour la santé humaine et l'environnement. Cette problématique est d'autant plus importante à considérer que la France est le troisième producteur mondial de produits phytosanitaires mais aussi, et de loin, le premier consommateur européen (100 000 tonnes de substances actives par an). Diverses études scientifiques ont montré que les résidus de pesticides peuvent être responsables d'effets néfastes sur la santé humaine notamment des troubles de la reproduction (oligospermie, puberté précoce), du développement du système nerveux, un dérèglement du système immunitaire, l'apparition de cancers de certains organes (thyroïde, sein, prostate, estomac) ainsi que des perturbations endocriniennes [2]. Une exposition à faibles doses peut donc avoir des conséquences sanitaires à long terme pour le consommateur. Plusieurs études ont d'ailleurs mis en évidence la présence de résidus de pesticides dans différentes matrices biologiques humaines : urine, sang, tissu adipeux, cordon ombilical, lait maternel et cheveux.

Du fait de l'exposition de la population en général et de certaines professions liées à la production ou à l'utilisation de ces pesticides, il s'avère important d'évaluer les niveaux de concentration des pesticides eux-mêmes et/ou de leurs métabolites dans les milieux biologiques. L'objet de ce travail est de présenter les techniques analytiques aujourd'hui disponibles pour assurer à la fois le diagnostic d'une intoxication aiguë et la surveillance du niveau d'exposition aux pesticides principalement dans le sang, milieu biologique de composition constante et facilement accessible quoique d'autres matrices puissent être également exploitées dans ce même but. On tentera aussi d'après les données de la littérature de situer pour chaque classe de produit les doses toxiques, les concentrations sanguines observées à l'occasion d'intoxications ou lors de la surveillance de la population en général et les difficultés analytiques rencontrées au moment du choix de la méthode de dosage sans oublier celles de l'interprétation des résultats.

2 Quelques considérations analytiques générales

Les pesticides ou leurs métabolites ne sont pas directement dosables dans les matrices biologiques, mises à part quelques rares méthodes immunochimiques [3]. En général les méthodes se déroulent en trois étapes :

- a) le prétraitement de l'échantillon pour séparer, pré-concentrer ou parfois dérivatiser le composé recherché ;
- b) l'analyse instrumentale proprement dite ;
- c) le traitement des données et l'interprétation des résultats.

2.1 Prétraitement de l'échantillon

Le but est d'isoler le ou les composés recherchés à partir de la matrice biologique complexe. Au fil des années, diverses procédures ont été développées dont l'extraction liquide-liquide (LLE), l'extraction en phase solide (SPE) sur

cartouches appropriées suivie d'une élution et la micro extraction en phase solide (SPME). Dans toutes ces méthodes, on a cherché essentiellement à simplifier, miniaturiser et assurer l'efficacité de l'extraction et de la purification de l'extrait qui consomment à la fois du temps et sont coûteuses en réactifs ou en solvants [4].

Actuellement c'est la SPME qui est le plus souvent citée. Cette technique d'extraction chimique, proposée au début des années 90 permet de réaliser une extraction et une concentration des composés qui se trouvent à l'état de traces dans un liquide ou un gaz. Le support est une fibre de silice fondue, placée à l'intérieur d'une aiguille creuse amovible. Sur cette fibre est greffée une phase stationnaire qui détermine la capacité d'extraction. La fibre est plongée dans la solution à analyser (on parle d'immersion de fibre) ou dans l'espace de tête au-dessus de la solution (on parle d'extraction *head space*). Les analytes vont être progressivement absorbés par la phase stationnaire. Après un temps suffisant appelé temps d'équilibration, il s'établit un équilibre de partage entre la phase solide constituée par la fibre et la phase gazeuse ou liquide. La fibre est ensuite rétractée dans l'aiguille et retirée de l'échantillon. On procède alors à la désorption dans un chromatographe en phase gazeuse (GC) ou dans un chromatographe en phase liquide (LC). Pour la GC, la fibre est abaissée dans l'injecteur chaud du chromatographe, les analytes sont thermiquement désorbés et transportés vers la colonne par le gaz vecteur. Dans la LC, la fibre est introduite dans une chambre de désorption où la phase mobile va éluer les analytes de la phase stationnaire pour les transporter vers la colonne pour analyse. Les phases stationnaires disponibles sont revêtues le plus souvent de polydiméthylsiloxane (PDMS), de polyacrylate (PA), de polydiméthylsiloxane-divinylbenzène (PDMS-DVB) ou encore de carbowax-divinylbenzène (CBW-DVB) très intéressant pour extraire les composés polaires. On peut parfois relarguer l'analyte par addition à l'échantillon de quelques grammes de sel (NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2SO_4). L'analyse du sang total requiert généralement une dilution préalable de l'échantillon dans l'eau distillée et l'addition de sels mais le rendement d'extraction est cependant plus faible qu'avec l'urine et en conséquence les limites de détection se révèlent moins bonnes.

Il existe également d'autres techniques de micro-extraction en phase liquide qui améliorent à la fois la sensibilité et la qualité de l'analyse et qui sont décrites dans une excellente revue générale signée de Lambropoulou et Albanis [5].

2.2 L'analyse instrumentale

Les techniques habituellement utilisées font le plus souvent appel à la GC ou la LC toutes deux couplées à la spectrométrie de masse seule (MS) ou en tandem (MS/MS). Les méthodes décrivent plutôt le dosage d'une famille de pesticides donnée et plus rarement d'un mélange de pesticides appartenant à des groupes distincts. Il faut bien reconnaître qu'une telle démarche représente un véritable challenge car tous ces composés ont des polarités, des pKa ou encore des volatilités différentes, ce qui complique à la fois l'extraction et l'analyse. La MS reste la méthode de choix : elle est très sensible et très sélective. Le tandem MS/MS permet une analyse très

spécifique et en même temps qu'elle augmente les limites de détection en évitant les interférences. Mais il existe encore de nombreux composés qui ne peuvent pas être analysés directement par GC du fait de leur faible volatilité, de leur forte polarité et/ou de leur instabilité thermique. La LC est alors devenue la méthode de choix pour résoudre ces problèmes car elle ne nécessite pas forcément de prétraitement et de purification des échantillons. La GC-MS et la LC-MS sont donc devenues aujourd'hui deux techniques complémentaires pour quantifier les pesticides dans l'environnement comme dans les milieux biologiques [6].

3 Méthodes analytiques modernes de dosages des groupes de pesticides dans le sang

3.1 Insecticides

3.1.1 Organochlorés (OC) et polychlorobiphényles (PCB)

Les OC et les PCB sont des polluants persistants de l'environnement, très souvent dosés simultanément. En raison de leur résistance à la dégradation et de leur forte solubilité dans les solvants organiques et les lipides, ces composés s'accumulent dans les tissus et les fluides biologiques. Ils sont comme nous l'avons dit plus haut responsables d'effets indésirables pour la santé humaine. L'extraction des OC à partir du sérum peut être réalisée par LLE ou SPE à l'aide de colonnes en C18. On procède ensuite à des étapes de purification pour éliminer les interférences provenant de la matrice grasseuse co-extraite. Ces étapes laborieuses et contraignantes de purification aboutissent à des extraits plus propres mais, par voie de conséquence, à des limites de détection plus faibles. Bien entendu s'y ajoute le risque d'une erreur analytique du fait de l'introduction d'étapes supplémentaires dans la préparation de l'échantillon. L'extrait purifié est ensuite analysé par GC sur colonne capillaire et détection par capture d'électrons (ECD), spectrométrie de masse simple (MS) ou en tandem (MS/MS).

Aujourd'hui la SPME est considérée comme une alternative utile à la LLE ou à la SPE : elle requiert beaucoup moins d'étapes et moins de manipulation de l'échantillon, donc plus de fiabilité sur le plan analytique.

En 2003, Barr et coll. [7] décrivent une technique permettant le dosage simultané de 11 pesticides OC et leurs métabolites dans le sérum en même temps que 38 PCB après extraction par SPE et dosage par GC-HRMS (spectrométrie de masse haute résolution) sur colonne DB-5MS. Les limites de détection (LOD) sont de l'ordre du pg/mL. À titre d'exemple, nous décrivons sommairement la méthode proposée récemment par Lopez et coll. [8] utilisant la SPME où le sérum, additionné de l'étalon interne (PCB 46) est dilué de moitié avec l'eau distillée et additionné de tampon phosphaté pH 3. L'extraction des OC (HCB, β HCH, Heptachlorepoxyde, pp'DDE, pp'DDT) et de divers PCB est réalisée par HS à l'aide d'une fibre PDMS et PDMS-DVB placée au dessus de l'échantillon agité à 900 rpm durant 50 min à 85 °C. Après absorption, la fibre est rétractée dans l'aiguille qui est introduite immédiatement après dans l'injecteur chaud du chromatographe. La désorption des pesticides est réalisée à 270 °C pendant 10 min puis les analytes

sont entraînés par le gaz vecteur (He, 5 mL/min) et séparés sur colonne capillaire DB-XLB selon une programmation de température bien précise, allant de 60 °C à 300 °C et enfin détectés par ECD. Les limites de détection vont de 5,4 pg/mL (pp'DDT) à 52 pg/mL (β HCH). Le pesticide le plus fréquemment observé est le pp'DDE, métabolite du pp'DDT, à la teneur moyenne de 2,1 ng/mL.

3.1.2 Organophosphorés (OP)

Les insecticides organophosphorés sont des agents chimiques toxiques qui agissent par inhibition des cholinestérases. Ce sont les plus employés dans le monde. Depuis la seconde guerre mondiale, plus de cent composés différents ont été commercialisés. En raison de leur disponibilité facile en milieu rural, de leur forte toxicité et de leur action rapide, ils provoquent de nombreux cas d'intoxications accidentelles estimées à 3 millions de cas par an et responsables de 220 000 morts sur la planète. Ils sont également utilisés parfois à des fins suicidaires.

Aujourd'hui, en dehors de la mesure de l'activité cholinestérasiq, qui manque cependant de sélectivité et de sensibilité pour les faibles expositions, le diagnostic de l'intoxication aux OP est réalisé par le dosage direct du composé dans le sang. Depuis 2000, cinq techniques (quatre par GC-MS et une par LC-MS) ont été proposées pour doser les OP présents dans le sang.

En 2001, Lacassie et coll. [9] ont publié une méthode de dosage de 29 OP dans le sang et le sérum impliquant une SPE sur cartouche Oasis suivie d'une élution par l'acétate d'éthyle. L'éluat est évaporé à sec sous courant d'azote et le résidu repris par l'acétate d'éthyle et analysé par GC-MS sur colonne capillaire PTE 5. L'ionisation est réalisée par impact électronique et l'acquisition en mode SIM. Les LOD vont de 5 à 25 ng/mL selon le pesticide et les limites de quantification (LOQ) vont de 10 à 50 ng/mL. Les auteurs observent une excellente linéarité de la réponse depuis la LOQ jusqu'à 1 μ g/L.

En 2002 Musshoff et coll. [10] présentent un procédé simple et rapide (44 min) de dosage de 22 OP par HS-SPME suivi d'un dosage par GC-MS. La quantification est assurée en mode SIM. La LOD se situe entre 0,01 et 0,3 μ g/g selon le pesticide.

Tsoukali et coll. [11] publient une méthode alliant la SPME à la GC-NPD (détecteur azote phosphore). Le plasma additionné de l'étalon interne (fénitrothion) et de NaCl est dilué dans un petit volume d'eau distillée. L'extraction des OP est réalisée par SPME en mode *head space* à l'aide d'une fibre PA et PDMS. Après désorption dans l'injecteur du chromatographe, la séparation des analytes (méthylparathion, malathion, parathion et diazinon) est réalisée sur colonne capillaire EC-5 avec programmation de température. Les LOD vont de 2 à 55 ng/mL selon les pesticides et la gamme de calibrage s'établit entre 0,02 et 20 μ g/mL.

Gallardo et coll. [12] proposent de doser le parathion et son métabolite, le paraoxon par SPME en mode immersion dans le sang total suivi d'une analyse par GC-MS. La fibre SPME constituée de PDMS et de CW-DVB est immergée directement dans l'échantillon contenant l'étalon interne (éthion) dilué dans l'eau déionisée durant cinq secondes puis désorbée

thermiquement dans l'injecteur du chromatographe une minute à 240 °C. Les analytes sont séparés sur colonne capillaire Ultra 2 avec programmation de température et détection par GC-MS. Le spectromètre de masse est en mode impact électronique. Les ions sélectionnés pour la quantification sont respectivement m/z 109, 139 et 186 pour le parathion, m/z 109, 149 et 275 pour le paraoxon et m/z 231, 153 et 125 pour l'étalon interne. Les LOD et les LOQ sont respectivement de 25 et 50 ng/mL pour le parathion et la LOD du paraoxon est de 50 ng/mL. La gamme de calibration est linéaire entre la LOQ et 50 μ g/mL.

Les mêmes auteurs proposent une technique sensiblement identique pour doser le quinalphos dans le sang et l'urine par SPME en immersion directe suivie d'une analyse chromatographique par GC-MS [13].

Inoue et coll. [14] ont publié récemment une méthode de dosage simple et rapide de dix OP (acéphate, méthidation, dichlorvos, fenthion, EPN, diazinon, phentoate, malathion, fénitrothion et cyanaphos) dans le sérum par LC-MS. Après déprotéinisation du sang par l'acétonitrile, une fraction aliquote du surnageant, additionnée de l'étalon interne (fénitrothion d6 ou diazinon d10) est injectée dans une colonne XTerra MS C18 utilisant comme phase mobile un mélange méthanol-formiate d'ammonium 10 mM. La détection est réalisée par MS triple quadripole équipé d'une interface APCI opérant en mode positif ou négatif. Les LOD vont de 0,125 à 1 μ g/mL selon les composés. Les auteurs observent une excellente linéarité depuis la LOQ (0,5 μ g/mL) jusqu'à 8 μ g/mL. Cette méthode s'avère intéressante aussi bien en toxicologie clinique que médico-légale.

3.1.3 Carbamates

Comme les OP, les carbamates sont des insecticides inhibiteurs des cholinestérases, mais l'inhibition est réversible contrairement à celle des OP. Les échantillons sanguins doivent donc être obtenus et analysés dès que possible après l'exposition.

Les techniques analytiques le plus souvent utilisées pour doser les carbamates sont la GC après dérivatisation mais ces insecticides en général, et leurs produits de transformation en particulier, sont souvent considérés comme des composés polaires et thermolabiles. Ces propriétés limitent donc l'utilisation de la GC. D'autres méthodes comme la HPLC-MS existent, mais elles exigent un matériel coûteux. La plupart des méthodes font appel à la LLE par solvants lors de la préparation de l'échantillon, mais ce procédé consomme du temps et présente de nombreux désavantages comme la formation d'émulsions. Récemment l'utilisation de la SPE à l'aide d'une cartouche à résine échangeuse de cations a été spécifiquement appliquée à l'extraction du propoxur [15].

Shinji et coll. [16] décrivent une méthode de dosage du methomyl dans le sang utilisant la GC-MS avec la diméthylglyoxine comme étalon interne. Le methomyl présent dans le sang est converti en son oxime par addition de soude. Le mélange est ensuite acidifié puis passé sur colonne Extrelut[®]. Le methomyloxime et l'étalon interne sont ensuite élués par un mélange de solvants organiques. L'éluat est alors concentré sous courant d'azote et soumis à une silylation par le

MTBSTFA et analysé par GC sur colle capillaire HP-1. Le dosage est réalisé par spectrométrie de masse en mode impact électronique (EI-MS). Les ions m/z 121 et 162 sont sélectionnés pour l'identification et la quantification du methomyl. La limite de détection est de 0,5 ng/g et la courbe de calibration est linéaire de 1 ng/g à 100 ng/g puis de 100 ng/g à 5000 ng/g.

Tracqui et coll. [17] ont développé en 2001 une technique de dosage de l'aldicarbe par HPLC et détection UV par barrettes de diodes. Brièvement 3 mL de sang sont extraits par le chloroforme en milieu tampon phosphate à pH 5,5 en présence de l'étalon interne (carbofuran). Après évaporation de la phase organique, l'extrait sec est repris par 30 μ L de méthanol et une fraction aliquote (10 μ L) est injectée dans une colonne Novapac[®] C18. L'éluion est réalisée par un mélange méthanol-THF-tampon phosphate 10 mM pH 2,6 (65-5-30) avec un débit de 0,8 mL/min. La LOD est de 0,05 μ g/mL et la LOQ de 0,10 μ g/mL.

Une technique utilisant la SPE suivie d'une HPLC avec détection à 270 nm a été proposée en 2005 par Suma et coll. [18] pour déterminer simultanément le propoxur et son métabolite principal, l'isopropoxyphénol dans le sang et l'urine, chez le rat.

3.1.4 Pyrethrinoïdes

Les insecticides pyréthrinoïdes (PYR) sont largement utilisés en agriculture pour protéger les semences, éliminer les insectes dans la maison et en santé publique pour contrôler les maladies provoquées par les vecteurs ou les hôtes intermédiaires. Les PYR représentaient 25 % environ du marché insecticide mondial en 1998. Ce pourcentage a augmenté substantiellement ces dernières années aux USA en raison de la réduction de l'usage des OP. La popularité des PYR tient également à plusieurs raisons : leur pouvoir insecticide, le développement lent d'une résistance de la part des insectes et enfin une toxicité relativement faible à l'égard des mammifères [19].

Chez les mammifères, les PYR sont rapidement métabolisés en leurs dérivés carboxyliques correspondants par hydrolyse de la liaison ester suivie d'une oxydation et d'une glucuroconjugaison permettant leur élimination urinaire. Du fait de cette métabolisation, la concentration des PYR intacts dans le sang ou le sérum diminue rapidement et en conséquence on préfère doser les métabolites urinaires pour assurer la surveillance biologique lors d'une exposition professionnelle [20-22].

Plusieurs approches immunologiques et chimiques ont été développées dans les années 70 mais aujourd'hui, là encore ce sont les techniques chromatographiques couplées éventuellement à la spectrométrie de masse qui ont pris le relais. Ainsi Ding et coll. [23] proposent une technique par HPLC pour doser la deltaméthrine, l'un des PYR les plus neurotoxiques. La méthode nécessite une précipitation des protéines par l'acétonitrile plutôt qu'une LLE ou la SPE pour préparer l'échantillon plasmatique. Cette méthode assez longue à mettre en œuvre permet cependant une limite de détection de 0,1 μ g/mL.

Ramesh et Ravi [24] ont publié en 2004 une méthode générale de dosage de 13 PYR dans le sang total par GC-MS. Les analytes (allethrin, bifenthrin, cyperméthrin, cyphonothrin, cyfluthrin, δ -cyhalothrin, deltaméthrin,

fenvelarate, fenprothrin, imiprothrin, perméthrin, prallethrin, transfluthrin) ainsi que l'étalon interne (lindane) sont extraits du sang par LLE par un mélange hexane-acétone (80-20). La phase organique est concentrée à 0,5 mL sous courant d'azote à 40 °C puis une fraction aliquote de l'extrait est injectée dans le chromatographe et séparé sur colonne capillaire avec programmation de température de 60 °C à 240 °C. L'identification et la quantification sont réalisées par EI-SIM. La LOQ va de 0,05 à 2 ng/mL selon le composé. C'est sans aucun doute la méthode de choix actuellement.

3.2 Rodenticides

Les rodenticides anticoagulants (warfarine, coumatetralyl, bromadiolone, diphacinone et chlorophacinone) sont des produits phytopharmaceutiques faciles d'accès et qui ont causé de nombreuses intoxications chez l'homme. Leur détection dans les milieux biologiques, généralement par HPLC, permet le diagnostic de l'intoxication. Il n'en est pas de même pour les appâts à base de strychnine dont la vente en pharmacie est très réglementée.

Chalermchaikit et coll. [25] en 1993 ont développé une méthode d'analyse de 8 rodenticides anticoagulants dérivés de la 4-hydroxycoumarine et de l'indanedione dans le sérum. Les anticoagulants sont extraits du sérum par l'acétonitrile. L'extrait organique est soumis à une SPE. L'éluat est évaporé à sec, reconstitué dans la phase mobile et analysé par HPLC-FL avec détection par fluorescence (excitation à 318 nm et émission à 390 nm). La LOD des hydroxycoumarines est de 1 ng/mL tandis que celle des indanediones est de 10 ng/mL. Une technique très voisine a été proposée par Fauconnet et coll. applicable au foie des animaux domestiques et/ou sauvages [26].

Tout récemment Jamey et coll. [27] ont présenté en 2008 une méthode de dosage de 7 rodenticides et 3 anticoagulants utilisés en thérapeutique humaine (acénocoumarol, fluindione et warfarine) dans le sang total par UPLC-MS/MS. L'échantillon de sang additionné de l'étalon interne (prazépam) est déprotéinisé par l'acétonitrile. La phase organique est évaporée et le résidu sec repris par la phase mobile. Les analytes sont séparés sur colonne UPLC[®] C18 à l'aide la phase mobile acétonitrile-méthanol [50,50] contenant 2 mM de formiate d'ammonium à pH 6 avec un débit de 0,5 mL/min. La quantification des ions se fait en mode MRM (*multiple reaction monitoring*). Les LOD vont de 0,05 à 2 ng/mL et les LOQ de 0,1 à 5 ng/mL.

En 2006 Coe et coll. [28] ont proposé une méthode de dosage de la warfarine par chromatographie liquide fluide supercritique couplée à la MS/MS mais cette technique s'avère difficile à appliquer en routine et serait plutôt du domaine de la recherche.

On peut doser le bromadiolone dans les matrices biologiques par HPLC-UV ou HPLC-FL mais l'identification de l'analyte par ces techniques reste ambiguë. Avec l'arrivée de l'ionisation par électrospray (ESI), la SM a joué un rôle important grâce à sa spécificité et sa sensibilité surtout si elle est en tandem MS/MS.

Jin et coll. en 2007 [29] ont développé une méthode HPLC-ESI-MS/MS pour doser le bromadiolone dans le sang total utilisant la warfarine comme étalon interne. Le bromadiolone est

extrait du sang total par LLE avec l'acétate d'éthyle. L'extrait organique est évaporé à sec sous courant d'azote à 50 °C puis dissous dans la phase mobile. La séparation est réalisée sur colonne Zorbax®Eclipse C18 avec le mélange acide acétique – acétate d'ammonium 5 mM, pH 4,5 – méthanol (20-80) en phase isocratique à 0,5 mL/min. La détection est réalisée par SM en mode négatif. La LOQ est de 0,5 ng/mL de sang.

Une technique de dosage de la strychnine par SPME-GC/EI-MS a été proposée récemment par Barroso et coll., en 2005 [30]. L'échantillon de sang additionné de l'étalon interne (papavérine) et d'eau est soumis à une SPME à l'aide d'une fibre CW-DVB en mode immersion durant 20 min. Après extraction, la fibre est rétractée puis désorbée thermiquement dans l'injecteur chaud du GC durant 5 min avant et 5 min après la *start run*. L'analyse est effectuée sur colonne capillaire Ultra2® en présence d'hélium comme gaz vecteur (1 mL/min) avec programmation de température de 150 °C à 280 °C. L'identification et la quantification des ions se font en mode SIM avec les ions *m/z* 334, 120 et 162 pour la strychnine. La LOD est de 6,8 ng/mL et la LOQ de 9 ng/mL.

3.3 Herbicides

Les herbicides regroupent toute une série de composés appartenant à des familles chimiques très différentes rendant ainsi toute classification impossible.

3.3.1 Phénoxyacétiques (2-4 D, 2-4-5 T, MCPA)

Ces composés furent synthétisés durant la seconde guerre mondiale et ont été largement et intensivement utilisés comme herbicides à partir des années 50. Des études épidémiologiques ont suggéré une relation entre l'usage des herbicides phénoxyacétiques et l'apparition du lymphome non hodgkinien. Les herbicides phénoxyacétiques sont faiblement biotransformés chez les mammifères. La détection dans l'urine des composés inchangés est utilisée depuis longtemps pour surveiller l'exposition humaine. Par suite de leur polarité, les herbicides acides sont généralement moins volatils et thermiquement instables. Par conséquent leur analyse par GC est difficile et nécessite l'utilisation de procédés de dérivation complexes. Cependant, ces dernières années, quelques études s'appuyant sur la LC-MS/MS ont été proposées pour analyser ces pesticides polaires sans dérivation [31–33]. Nous avons trouvé une méthode très récente proposée par Xin et coll. [34], en 2008 permettant leur dosage dans le sang, décrite en chinois, mais heureusement avec un résumé anglais ! L'échantillon de sang dilué avec HCl 0,1 M est extrait par SPE sur résine poreuse GDX401. L'éther éthylique permet d'éluer les analytes qui sont estérifiés par le dichloropropanol en présence d'acide sulfurique comme catalyseur. Les dérivés estérifiés sont alors dosés par GC-ECD. Les LOD du 2-4 D, 2-4-5 T et du MCPA sont respectivement de 20,8 et 40 ng/mL.

3.3.2 Chlorates

Une technique par chromatographie ionique a été proposée par Eysseric et coll. [35] en 1999 sur colonne échangeuse

d'anions couplée à une détection par conductimétrie. La réponse est linéaire de 1 à 15 mg/L.

3.3.3 Urées substituées (diuron, linuron, moniuron, etc.)

Les herbicides dérivés de l'urée sont thermolabiles, mais on peut les stabiliser par méthylation ce qui permet leur analyse par GC. On préfère cependant la méthode HPLC-MS pour doser le diuron comme proposé par Van Boven et coll., en 1990 [36]. L'échantillon biologique (urine ou sang) acidifié à pH 2 est extrait par le dichlorométhane. Après centrifugation, la phase organique est évaporée à sec sous courant d'azote. Le résidu est alcalinisé à pH 11 puis ré-extrait par le dichlorométhane et de nouveau concentré. Les extraits organiques sont rassemblés et analysés par HPLC sur colonne Lichrosorb® Si60 et élués par un mélange dichlorométhane-méthanol (95-5) à un débit de 1 mL/min. L'identification et la quantification sont réalisées en mode ESI-SIM.

3.3.4 Triazines (atrazine, simazine)

L'atrazine et ses métabolites peuvent être dosés après SPE par HPLC-MS/MS et quantifiés par dilution isotopique dans l'urine [37]. La LOD est de 0,03 à 2,80 ng/mL selon les composés et la courbe de calibration est linéaire de la LOD jusqu'à 40 ng/mL pour l'atrazine.

3.3.5 Bipyridilium (diquat, paraquat)

L'ingestion des ammoniums quaternaires (Diquat ou Paraquat, DQ et PQ), deux herbicides largement utilisés dans le monde, est rare mais extrêmement toxique pour l'homme. La plupart des intoxications sérieuses est due à une ingestion délibérée de formulations liquides de ces herbicides. La mort survient en quelques jours. Les survivants souffrent de séquelles sévères.

L'analyse de ces herbicides par GC est spécialement difficile en raison de leur forte polarité et de leur faible volatilité. Aussi une transformation préalable de ces composés en substances thermiquement stables et volatiles est nécessaire avant l'injection. Diverses méthodes ont été utilisées par le passé pour les doser dans le sérum ou dans l'urine : colorimétrie avec le dithionite, spectrométrie UV, chromatographie, etc. De nos jours c'est l'électrophorèse capillaire et la GC-MS ou la LC-MS qui s'avèrent les plus efficaces.

Vinner et coll. [38] en 2001 ont proposé une technique par électrophorèse capillaire où le sérum est déprotéiné par un mélange chloroforme-sulfamate d'ammonium puis les herbicides sont extraits par le phénol liquéfié à 60 °C et analysés par EC et détectés par UV à 200 nm. La LOD est de 5 pg/mL pour les deux composés. Nuñez et coll. [39] ont également proposé une technique simple par EC pour doser simultanément le DQ, le PQ et le difenzoquat mais la détection et la quantification sont assurées par SM. La LOD se situe entre 0,5 et 2,5 mg/L.

De Almeida et Yonamine publient en 2007 [40] une méthode de dosage du DQ et du PQ dans le plasma et l'urine par GC-MS. Les analytes présents dans l'échantillon contenant

l'étalon interne (éthylparaquat) sont traités par le borohydrure de sodium en milieu tampon phosphaté à pH 8. Ce procédé permet de réduire les ammoniums quaternaires en composés plus volatils qui seront ensuite extraits par SPE sur cartouche C 18. La GC-MS est utilisée pour identifier et quantifier les analytes en mode SIM. Les LOD sont de 0,05 mg/L pour les deux herbicides. La courbe de calibration est linéaire de 0,01 (LOQ) à 50 mg/L.

Une méthode proposée par Lee et coll., en 2004 [41] permet de doser le DQ et le PQ par HPLC-ESI-MS/MS. Les composés sont extraits sur cartouche Sep-Pack[®] C18 après addition de l'étalon interne (éthylparaquat) à l'échantillon de sang total. La séparation des analytes est réalisée par chromatographie ionique avec une phase mobile constituée d'acide heptafluorobutyrique dans 20 mM d'acétate d'ammonium et d'acétonitrile. L'identification et la quantification des analytes sont réalisées en mode SRM (*selective reaction monitoring*). Les courbes de calibration sont linéaires de 25 à 400 ng/mL pour les deux composés. La LOQ est de 10 ng/mL pour le PQ et de 5 ng/mL pour le DQ.

Ariffin et Anderson [42], en 2006 ont mis au point une méthode de dosage des ammoniums quaternaires (8 agents curarisants et 3 herbicides) très proche de la précédente dans le sang total par HPLC-ESI-MS/MS après extraction des composés sur cartouche Bond Elut[®]. Les LOQ sont de 3,6 à 20,4 ng/mL selon les composés.

3.3.6 Amides substituées (alachlor)

L'alachlor et ses métabolites peuvent être dosés dans le sérum, chez le rat, par HPLC-ESI-MS après isolement des analytes sur des cartouches Oasis[®] [43].

3.3.7 Dinitroanilines (oryzaline, triflurafen)

Les herbicides sont isolés par SPME. Le sang est dilué de moitié dans l'eau en présence de Na₂SO₄. La fibre (PDMS) est exposée en condition *head space* à 70 °C durant 30 min puis est désorbée dans l'injecteur chaud du GC et dosés par ECD. La courbe de calibration est linéaire de 0,1 à 10 ng/mL [44].

3.3.8 Organophosphorés (glyphosate)

Malgré sa faible toxicité expérimentale, le glyphosate (Round Up) a été responsable d'intoxications humaines létales après ingestion dans un but suicidaire. De nombreuses techniques analytiques ont été proposées pour doser cet herbicide organophosphoré dans les milieux biologiques. La GC-MS nécessite une dérivation par perfluoroacétylation [45]. La HPLC-UV requiert aussi une dérivation pour augmenter le seuil de détection [46]. D'autres méthodes comme l'EC [47] ou la chromatographie ionique [48] peuvent être également citées. Plus récemment, Cartigny et coll. [49], en 2004 ont décrit une technique par résonance magnétique nucléaire (RMN).

3.4 Fongicides

Outre les composés minéraux (soufre, KMnO₄, arsénites, cuivre, organométalliques à base d'étain ou de mercure) qui

peuvent être facilement identifiés aujourd'hui par ICP-MS, les principaux groupes de fongicides organiques comprennent les dithiocarbamates et les benzimidazoles.

3.4.1 Diéthylthiocarbamates

Les thiurames et les diéthylthiocarbamates (DTC) sont largement utilisés en agriculture comme désinfectants des semences, fongicides et insecticides et représentent donc une source d'exposition environnementale pour l'homme. La méthode proposée par Ye et coll. [50] en 2002 repose sur le fait que le DTC réagit quantitativement avec les groupes -SH du 1,2-benzènedithiol pour donner un produit de condensation cyclique, le 1,3-benzodithiol-2-thione, qui absorbe fortement dans l'UV à 365 nm. Le produit de cyclocondensation peut être séparé par une simple HPLC sur colonne Partisil10[®] ODS-2. La quantification est assurée par l'intégration du pic par le détecteur à barrettes de diodes. Si la cyclisation s'avère facile pour les échantillons d'urine, elle se révèle plus complexe pour le sang ou les tissus. Le contenu protéique du sang ou des tissus peut être réduit par une précipitation à l'aide du polyéthylène glycol ou par ultrafiltration et on peut augmenter la sensibilité de la technique grâce à la SPE du produit de cyclocondensation.

Debbarh et coll. [51] proposent en 2004, une méthode HPLC permettant le dosage des dithiocarbamates (zineb, maneb, mancozeb, metiram) et de l'éthylèthiourée (ETU), leur produit de dégradation commun par cette même technique sur colonne μ Bondapack[®] C 18 avec une phase mobile méthanol-eau (70-30). La calibration est linéaire de 0,25 à 100 μ g/mL. La LOD et la LOQ sont respectivement de 0,1 et 0,25 μ g/mL.

3.4.2 Benzimidazoles

Les benzimidazoles (benomyl, carbendazim) sont des fongicides polyvalents destinés à protéger les récoltes, les fruits cueillis et les végétaux. Ce sont également des anthelminthiques utilisés chez l'homme ou les animaux par voie orale. Ces composés peuvent être extraits des milieux biologiques par LLE (ether éthylique, solvants chlorés, acétate d'éthyle) parfois après élimination des protéines par l'acétonitrile. On peut aussi diluer simplement le plasma avant de procéder à une SPE sur cartouche C 18 puis élution par le méthanol. L'analyse fait ensuite appel à l'HPLC avec détection UV ou par fluorescence. Mais ces dernières années c'est la LC-MS qui offre une plus grande sensibilité et une meilleure spécificité [52].

3.5 Méthodes « multirésiduelles »

Le screening large spectre est parfois nécessaire en toxicologie clinique ou médico-légale. Diverses méthodes utilisant différentes techniques d'extraction et d'identification par MS ont été proposées ces six dernières années dans l'urine ou dans le sérum. En particulier, une méthode pour le dosage simultané de 12 métabolites phénoliques urinaires de pesticides a été développée par Bravo et coll. [53] combinant la SPE, la dérivation chimique et la GC-MS/MS avec dilution isotopique. Les LOD se situent entre 0,1 et 0,3 μ g/L.

Une méthode LC-APCI-MS/MS a été développée pour le dosage simultané urinaire de l'atrazine, du diazinon, du malathion, du 2-4D et certains pyréthri-noïdes synthétiques qui utilise une hydrolyse enzymatique suivie d'une extraction par solvants organiques. Les LOD sont suffisamment basses pour permettre la surveillance des personnes exposées.

Olson et coll. [31] ont développé une méthode multirésidus pour analyser 19 marqueurs de pesticides communément utilisés dans l'urine chez l'homme. La technique requiert une hydrolyse enzymatique suivie d'une extraction SPE. Tous les analytes, excepté les pyréthri-noïdes sont analysés avec interface APCI ou TIS. Le volume de l'échantillon est très faible (2 mL) et l'analyse se déroule en 28 min.

Enfin Norrgran et coll. [32] proposent une méthode multirésidus pour doser 6 métabolites d'herbicides dans l'urine utilisant la SPE suivie d'une dilution isotopique et analyse par LC-APCI-MS/MS. La LOD est inférieure à 0,1 ng/mL pour les 6 analytes en mode MRM.

Dans le sang, Hernandez et coll. [54] en 2002 puis Pitarch et coll. [55] ont proposé en 2003 une méthode rapide permettant de doser simultanément 16 pesticides OC et OP ainsi que quelques PCB dans le sérum. Les analytes sont isolés par SPE sur cartouche en C 18 et sont dosés ensuite par GC-MS/MS.

Lacassie et coll. [56] utilisent la GC-MS pour déterminer 47 pesticides volatils (OC, OP, phtalimide, uracil, triazines) et 14 pesticides polaires et thermolabiles (carbamates et benzimidazoles) dans le sérum par LC-MS après une étape SPE. Les LOD varient de 2,5 à 50 µg/L. Barr et coll. [57] ont réalisé l'analyse multirésiduelle de 29 pesticides dans le sérum ou le plasma en utilisant une simple extraction SPE sur cartouche Oasis® puis GC-HRMS avec dilution isotopique. Les LOD se situent en dessous du pg/g pour 4 analytes. Comme le signalent les auteurs, la HRSM est efficace pour réduire les interférences de la matrice résiduelle et apporter une meilleure spécificité qu'avec les seuls quadrupoles ou autres spectromètres de masse basse résolution.

De nouvelles méthodes continuent d'être publiées pour estimer également l'exposition prénatale aux pesticides. Ainsi Corion et coll. [58] ont décrit une méthode GC-EI-MS pour doser des pesticides de classes variées et leurs métabolites dans le sang maternel et le cordon ombilical. Cette méthode utilise la LLE et fournit des LOD de moins de 0,10 à 2 µg/mL pour le pesticide parent et ses métabolites respectivement.

4 Discussion

Sur un plan très général les pesticides représentent un groupe de molécules chimiques très différentes d'une classe à l'autre avec des caractéristiques physico-chimiques (volatilité, pKa, thermostabilité, polarité, solubilité dans les solvants, etc.) qui vont nécessiter la mise au point de techniques de dosage variées et par voie de conséquence un équipement analytique très diversifié, ce qui peut être d'ailleurs un handicap pour de nombreux laboratoires. Par ailleurs la mise au point de ces méthodes requiert l'obtention d'étalons de référence purs et de matrices certifiées difficilement accessibles sur le marché actuellement.

Au niveau de la préparation des échantillons d'énormes progrès ont été accomplis ces dernières années pour faciliter

la tâche du technicien et éviter l'emploi d'un trop grand volume de solvant. Mais est-on sûr que la LLE, la SPE ou la SPME fournissent les mêmes résultats ? Il serait intéressant de comparer sur un même échantillon les capacités d'extraction de chacune de ces techniques vis-à-vis des molécules recherchées.

Sur le plan instrumental, comme on peut le constater, il existe tout un arsenal de méthodes pour doser les pesticides dans le sang. Bien souvent nous avons cité la GC-MS et la LC-MS mais à chaque fois dans des conditions expérimentales spécifiques et avec un type de détection propre à chaque groupe de pesticides ou chaque molécule incriminée. Il n'existe donc pas de méthode universelle et par ailleurs ces deux techniques assez sophistiquées nécessitent à la fois un matériel coûteux pour le laboratoire et surtout un technicien expérimenté. En outre il ne semble pas exister de méthodes officielles ou recommandées par des organismes ou des associations reconnues. Il existe bien quelques méthodes « multirésiduelles » proposant de doser plusieurs pesticides de familles différentes, mais elles sont très rares. À quand un screening « pesticides » comme il en existe aujourd'hui pour les médicaments ?

Après l'analyse, il faut interpréter le résultat. Comme souligné par Dulaurent et coll. [59], le délai de rendu des résultats demeure actuellement trop long pour être compatible avec la mise en place d'un traitement curatif. Cela peut être dû à l'imprécision de la demande mais aussi à la non disponibilité des étalons, à la nécessité de créer une nouvelle technique ou encore à la difficulté de trouver un marqueur d'effet ou de dose nécessitant alors d'effectuer une longue recherche bibliographique. Mais la difficulté majeure de l'interprétation des résultats tient surtout à notre mauvaise connaissance de la toxicocinétique des pesticides chez l'homme et au fait que les métabolites identifiés peuvent être communs à plusieurs pesticides de toxicité totalement différente. Nous avons essayé de regrouper dans le tableau I les renseignements d'ordre toxicologique dont on peut disposer aujourd'hui d'après les données de la littérature : doses toxiques, concentrations sanguines « physiologiques » et concentrations sanguines « toxiques » chez l'homme. Nous constatons à première vue l'immense effort à accomplir pour pouvoir répertorier les données concernant l'ensemble des pesticides et le peu de références dont nous disposons aujourd'hui. Les doses toxiques chez l'homme varient d'un groupe à l'autre des pesticides et il apparaît très difficile de fixer une dose toxique « unique ». Il en est de même, par voie de conséquence pour les concentrations sanguines ou sériques létales ce qui justifie parfois la recherche d'une limite de quantification très faible. L'interprétation des résultats de l'analyse constitue donc un problème majeur qui pourtant intéresse au premier chef le clinicien qui aimerait bien mettre en place dès que possible, un traitement spécifique et efficace.

5 Conclusion

Le dosage des pesticides et de leurs métabolites dans le sang permet à la fois le diagnostic d'une intoxication mais aussi la surveillance d'une exposition professionnelle ou environnementale. D'une façon très générale, après traitement de l'échantillon par extraction en phase solide (SPE ou SPME),

Tableau I. Doses toxiques et concentrations sanguines ou sériques physiologiques ou létales de quelques pesticides (d'après R.C. Baselt*, P. Kintz**, TIAFT*** *Therapeutic and toxic drug concentration*).

Groupe de pesticides	Composé usuel	Dose toxique pour l'homme	[Sang-sérum] physiologique	[Sang-sérum] létale
Organochlorés	aldrine	5 g	0,0015 mg/L	0,0035 mg/L
	chlordane	6-60 g	0,001 mg/L	1-7 mg/L
	chlordécone		0,007-0,06 mg/L	0,5 mg/L
	dieldrine	5 g	0,0015 mg/L	0,15-0,30 mg/L
	DDT	3-30 g	0-013 mg/L	
	lindane	7-15 g	0,001 mg/L	
Organophosphorés	azinphos	0,1 g		
	chlorpyrifos	1-2,5 g		0,2 mg/L
	dichlorvos	1 g		29 mg/L
	malathion	5 g		0,5-3,5 mg/L
	parathion	0,1 g		0,01-0,08 mg/L
	phosalone	1 g		
	trichlorfon	5 g	1,5-4 mg/L	
Carbamates	aldicarbe	?		4,8-11 mg/L
	carbaryl	?		6-27 mg/L
	methomyl	1 g		8-57 mg/L
	propoxur	?		
Pyréthroïdes	perméthrine	> 20 g		1 mg/L
Anticoagulants	brodifacoum	1-100 mg		4 mg/L
	bromadiolone			0,02 mg/L
	warfarine		1-3 mg/L	10-100 mg/l
Phénoxyacétiques	2-4 D	28 g	0,2 mg/L	58-826 mg/L
	M C P A			100-500 mg/L
Benzonitriles		10 - 20 g	< 20 mg/L	> 300 mg/L
Bipyridilium	diquat	60 g		0,1-0,4 mg/L
	paraquat	1-2 g		2 (4h) - 0,1mg/L (24h)
Divers	strychnine	60-100 mg		0,2-2 mg/L
	chloralose	> 10 g		
	PCP	2 g	0-0,2 mg/L	> 45 mg/L

* Baselt RC. Disposition of toxic drugs and chemicals in man 6th Edn. Biomedical Publications, 2002.

** Kintz P. Toxicologie et Pharmacologie médico-légales. Paris Éditions scientifiques et médicales Elsevier 1998.

*** Document consulté sur le site <http://www.tiaft.org/tmembers/ttv/ttvidx.php>, le 20 octobre 2008.

l'analyse instrumentale fait appel aux méthodes de chromatographie classiques comme la chromatographie en phase gazeuse (GC) ou la chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplées toutes deux à la spectrométrie de masse simple (MS) ou en tandem (MS/MS). Certaines méthodes permettent la caractérisation de plusieurs pesticides d'un même groupe ou parfois d'un ensemble de pesticides appartenant à différentes familles (méthodes multirésiduelles). Il n'existe pas aujourd'hui de méthode unique universelle de dosage des pesticides dans le sang. Toutes les méthodes proposées nécessitent un matériel coûteux et des techniciens expérimentés. La mise en place d'une méthodologie requiert donc une demande bien précise du clinicien. Des difficultés subsistent car les doses toxiques, de même que les concentrations retrouvées dans le sang sont très variables d'un composé à l'autre et justifient la recherche d'une limite de quantification (LOQ) parfois très faible. L'obtention d'étalons de référence purs ou de matrices biologiques certifiées est très limitée. Enfin, l'interprétation

des résultats constitue sans doute le problème majeur car la toxicocinétique des pesticides est généralement mal connue et difficile à établir chez l'homme.

Il apparaît évident que le développement d'un screening général de recherche des pesticides, comme il en existe un actuellement pour les médicaments, puisse rapidement voir le jour afin de raccourcir le délai de réponse du laboratoire au clinicien qui pourra alors décider d'un traitement curatif spécifique et efficace.

Références

1. Aprea C et coll. Biological monitoring of pesticide exposure: a review of analytical methods. *J Chromatogr B*. 2002; 769: 191-219.
2. Margariti MG, Tsakalof AK, Tsatsakis AM. Analytical methods of biological monitoring for exposure to pesticides: recent update. *Ther Drug Monit*. 2007; 29(2): 150-163.

3. Koivunen ME et coll. Monitoring human exposure to pesticides using immunoassay. A.C.S. symposium series ISSN0097-6156 CODEN ACSMC8. 2007; 951: 141-156.
4. Beltran J, Lopez FJ, Hernández F. Solid-phase microextraction in pesticide residue analysis. *J Chromatogr A*. 2000; 885: 389-404.
5. Lambropoulou DA, Albanis TA. Liquid-phase micro-extraction in pesticide residue analysis. *J Biochem Biophys Methods*. 2007; 70: 195-228.
6. Hernández F, Sancho JV, Pozo OJ. Critical review of the application of liquid chromatography/mass spectrometry to the determination of pesticide residues in biological samples. *Anal Bioanal Chem*. 2005; 382: 934-946.
7. Barr JR et coll. New high-resolution mass spectrometric approach for the measurement of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in human serum. *J Chromatogr B*. 2003; 794(1): 137-148.
8. Lopez R et coll. Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human serum using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-electron capture detection. *J Chromatogr B*. 2007; 846(1-2): 298-305.
9. Lacassie E et coll. Multiresidue determination method for organophosphorus pesticides in serum and whole blood by gas chromatography-mass-selective detection. *J Chromatogr B*. 2001; 759: 109-116.
10. Musshoff F, Junker H, Madea B. Simple determination of 22 organophosphorus pesticides in human blood using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *J Chromatogr Sci*. 2002; 40(1): 29-34.
11. Tsoukali H et coll. Solid phase microextraction gas chromatographic analysis of organophosphorus pesticides in biological samples. *J Chromatogr B*. 2005; 822(1-2): 194-200.
12. Gallardo E et coll. Determination of parathion in biological fluids by means of direct solid-phase microextraction. *Anal Bioanal Chem*. 2006; 386(6): 1717-1726.
13. Gallardo E et coll. Determination of quinalphos in blood and urine by direct solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 2006; 832: 162-168.
14. Inoue S et coll. Rapid simultaneous determination for organophosphorus pesticides in human serum by LC-MS. *J Pharm Biomed Anal*. 2007; 44(1): 258-264.
15. Ramagiri S, Kosanam H, Sai Prakash PK. Stability study of propoxur (Baygon) in whole blood and urine stored at varying temperature conditions. *J Anal Toxicol*. 2006; 30(5): 313-316.
16. Shinji I et coll. Sensitive determination of methomyl in blood using gas chromatography-mass spectrometry as its oxime tert-butyltrimethylsilyl derivative. *J Chromatogr B*. 1998; 713: 323-330.
17. Tracqui A et coll. Repeated measurements of aldicarb in blood and urine in case of nonfatal poisoning. *Hum Exp Toxicol*. 2001; 20(12): 657-660.
18. Suma R et coll. Simple liquid chromatographic method for the rapid and simultaneous determination of propoxur and its major metabolite isopropoxy phenol in rat blood and urine using solid-phase extraction. *J Anal Toxicol*. 2005; 29(7): 728-733.
19. Kim KB et coll. Rapid determination of the synthetic pyrethroid insecticide, deltamethrin in rat plasma and tissues by HPLC. *J Chromatogr B*. 2006; 834: 141-148.
20. Schettgen T et coll. New gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of urinary pyrethroid metabolites in environmental medicine. *J Chromatogr B*. 2002; 778: 121-130.
21. Baker SE, Olsson AO, Barr DB. Isotope dilution high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantifying urinary metabolites of synthetic pyrethroid insecticides. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2004; 46: 281-288.
22. Leng G, Gries W. Simultaneous determination of pyrethroid and pyrethrin metabolites in human urine by gas chromatography-high resolution mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 2005; 814: 285-294.
23. Ding Y et coll. Determination of deltamethrin and its metabolite 3-phenoxybenzoic acid in male rat plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B*. 2004; 810: 221-227.
24. Ramesh A, Ravi PE. Electron ionization gas chromatography-mass spectrometric determination of residues of thirteen pyrethroid insecticides in whole blood. *J Chromatogr B*. 2004; 802: 371-376.
25. Chalermchaikit T, Felice LJ, Murphy MJ. Simultaneous determination of eight anticoagulant rodenticides in blood serum and liver. *J Anal Toxicol*. 1993; 17(1): 56-61.
26. Fauconnet V, Pouliquen H, Pinault L. Reversed-Phase HPLC Determination of eight anticoagulant rodenticides in animal liver. *J Anal Toxicol*. 1997; 21: 548-552.
27. Jamey C, Tracqui A, Ludes B. Rapid determination of anticoagulants and rodenticides in blood by UPLC-MS/MS. Communication poster présentée au 46ème congrès international du T.I.A.F.T Martinique 2-8 Juin 2008.
28. Coe RA, Rathe JO, Lee JW. Supercritical fluid chromatography-tandem mass spectrometry for fast bioanalysis of R/S-warfarin in human plasma. *J Pharm Biomed Anal*. 2006; 42: 573-580.
29. Jin MC et coll. Determination of bromadiolone in whole blood by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Forensic Sci Int*. 2007; 171(1): 52-56.
30. Barroso M et coll. Application of solid phase microextraction to the determination of strychnine in blood. *J Chromatogr B*. 2005; 816: 29-34.
31. Olsson AO et coll. A liquid chromatography-tandem mass spectrometry multiresidue method for quantification of specific metabolites of organophosphorus pesticides, synthetic pyrethroids, selected herbicides and DEET in human urine. *Anal Chem*. 2004; 76: 2453-2461.
32. Norrgran J et coll. Quantification of six herbicide metabolites in human urine. *J Chromatogr B*. 2006; 830: 185-195.
33. Garry VF et coll. Biomarker correlations of urinary 2-4 D levels in foresters: genomic instability and endocrine disruption. *Environ Health Persp*. 2001; 109: 495-500.
34. Xin G et coll. Determination of three phenoxyalkanoic acid herbicides in blood using gas chromatography coupled with solid-phase extraction and derivatization. *Se Pu*. 2008; 26(1): 118-118.
35. Eysseric H et coll. A fatal case of chlorate poisoning: confirmation by ion chromatography of body fluids. *J Forensic Sci*. 2000; 45(2): 474-477.
36. Van Boven M, Laruelle L, Daenens P. HPLC analysis of diuron and metabolites in blood and urine. *J Anal Toxicol*. 1990; 14: 231-234.
37. Panuwet P et coll. Quantification of atrazine and its metabolites in urine by on-line solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2008; 39(15): 1931-1939.
38. Vinner E et coll. Separation and quantification of paraquat and diquat in serum and urine by capillary electrophoresis. *Biomed Chromatogr*. 2001; 15: 342-347.

39. Nuñez O, Moyano E, Galceran MT. Capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of quaternary ammonium herbicides. *J Chromatogr A*. 2002; 974(1-2): 243-255.
40. De Almeida RM, Yonamine M. Gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of the herbicides paraquat and diquat in plasma and urine samples. *J Chromatogr B*. 2007; 853(1-2): 260-264.
41. Lee XP et coll. Determination of paraquat and diquat in human body fluids by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom*. 2004; 39(10): 1147-1152.
42. Arrifin MM, Anderson RA. LC/MS/MS analysis of quaternary ammonium drugs and herbicides in whole blood. *J Chromatogr B*. 2006; 842: 91-97.
43. Zang LY et coll. Determination of alachlor and its metabolites in rat plasma and urine by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 2002; 767: 93-101
44. Guan F et coll. Headspace solid-phase microextraction and gas chromatographic determination of dinitroaniline herbicides in human blood, urine and environmental water. *J Chromatogr B*. 1998; 714(2): 205-213.
45. Hida M, Mitsui Y, Fujimura Y. GC pyrolysis and GC/MS for determination of glyphosate in human blood. *Bunseki Kagaku*. 1989; 38: 87-91.
46. Tomita M et coll. High-performance liquid chromatographic determination of glyphosate and (aminomethyl) phosphonic acid in human serum after conversion into *p*-toluenesulphonyl derivatives. *J Chromatogr*. 1991; 566(1): 239-243.
47. Tomita M et coll. Determination of glyphosate and its metabolite (amino-methyl) phosphonic acid in serum using capillary electrophoresis. *J Chromatogr*. 1991; 571(1-2): 324-330.
48. Parrot F, Bedry JC, Favarel-Guarrigues JC. Glyphosate herbicide poisoning: use of a routine aminoacid analyser appears to be a rapid method for determining glyphosate and its metabolite in biological fluids. *Clin Toxicol*. 1995; 33(6): 695-698.
49. Cartigny B et coll. Determination of glyphosate in biological fluids by ¹H and ³¹P NMR spectroscopy. *Forensic Sci Int*. 2004; 143: 141-145.
50. Ye L et coll. Quantitative determination of dithiocarbamates in human plasma, serum, erythrocytes and urine: pharmacokinetics of broccoli sprout isothiocyanates in humans. *Clin Chim Acta* 2002; 316(1-2): 43-53.
51. Debbarh I et coll. Identification and quantification by high-performance liquid chromatography of mancozeb following derivatization by 1,2-benzenedithiol. *J Anal Toxicol*. 2004; 28(1): 41-45.
52. Danaher M et coll. Review of methodology for the determination of benzimidazole residues in biological matrices. *J Chromatogr B*. 2007; 845: 1-37.
53. Bravo R et coll. Quantification of phenolic metabolites of environmental chemicals in human urine using gas chromatography-tandem mass spectrometry and isotope dilution quantification. *J Chromatogr B*. 2005; 820: 229-236.
54. Hernandez F et coll. Headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and tandem mass spectrometry for the determination of organochlorine and organophosphorus pesticides in whole human blood. *J Chromatogr B*. 2002; 769: 65-77.
55. Pitarch E et coll. Rapid multiresidue determination of organochlorine and organophosphorus compounds in human serum by solid-phase extraction and gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2003; 376(2): 189-197.
56. Lacassie E et coll. Sensitive and specific multiresidue methods for the determination of pesticides of various classes in clinical and forensic toxicology. *Forensic Sci Int*. 2001; 121: 116-125.
57. Barr DB et coll. A multi-analyte method for the quantification of contemporary pesticides in human serum and plasma using high-resolution mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 2002; 778: 99-111.
58. Corion ML et coll. Detection of prenatal exposure to several classes of environmental toxicants and their metabolites by gas chromatography-mass spectrometry in maternal and umbilical cord blood. *J Chromatogr B*. 2005; 822: 221-229.
59. Dulaurent S et coll. Treatment of pesticides determination requests in biological samples: some problems frequently encountered. *Acta Clin Belg Suppl*. 2006; 1: 71-76.