

Nano-détection du fipronil et de ses principaux métabolites dans diverses matrices apicoles

Gaëlle Daniele*^a, Hervé Casabianca^a, Marion Courtiade^a, Jean-Marc Bonmatin^b, Patrice Marchand^b

^aService Central d'Analyse du CNRS, Echangeur de Solaize, chemin du canal, 69360 Solaize

^bCentre de Biophysique Moléculaire, CNRS, UPR 4301, 45071 Orléans Cedex 02

Résumé

Le fipronil, substance active du Régent TS[®] est utilisé pour l'enrobage des semences, notamment de maïs et de tournesol. Neurotoxique puissant, ses principaux métabolites sont également toxiques.

Nous avons mis au point et validé des méthodes qui permettent de détecter et quantifier, de manière très spécifique et très sensible, le fipronil et trois de ses principaux métabolites à l'état de traces et ultra-traces dans diverses matrices du monde apicole (pollen, abeilles, miel). Après des étapes d'extraction et de purification, l'analyse a été conduite par GC-MS et nous avons atteint des seuils de détection et de quantification inférieurs au ng/g.

Mots-clés

Nano-détection, pesticide, fipronil, métabolites, miel, pollen, abeilles

Introduction

Le fipronil est un insecticide de la classe des phénylpyrazoles. Il entre dans la composition de diverses préparations utilisées dans certains médicaments vétérinaires, pour le traitement des jardins-amateurs ou en agriculture. C'est ce dernier domaine qui emploie le plus largement le fipronil. En effet, plusieurs spécialités à base de fipronil ont obtenu une autorisation de mise sur le marché et d'utilisation sur le territoire français, notamment pour le traitement du maïs et du tournesol avant d'être ensuite suspendues (2005).

Deux modes d'application sont préconisés : le dépôt d'appâts granulés dans le sillon des cultures avant les opérations de semis, et l'utilisation de semences préalablement enrobées avec la matière active à l'aide de suspensions concentrées.

En France l'enrobage des semences (maïs, tournesol, orge,...) à base de fipronil a pris une ampleur croissante depuis 1996. La quantité totale de fipronil commercialisée au travers des spécialités à usage agricole en France, de 1998 à 2004, a été de 286 115 tonnes avec un pic en 2001 correspondant à 60 794 tonnes.

Le fipronil est un neurotoxique puissant. Il agit directement sur le système nerveux central par l'intermédiaire du récepteur du GABA (acide gamma-aminobutyrique). Il bloque ce récepteur qui commande les canaux chlore, ce qui engendre une hyperexcitation chez les insectes ou chez les mammifères, conduisant à la mort par convulsions [1].

Les risques environnementaux dus à l'utilisation de cet insecticide ont d'abord été révélés par les pollinisateurs [2-4]. En effet, les résidus de fipronil et de ses métabolites (appelés fiproles) présents dans la plante traitée engendrent potentiellement un risque pour les insectes non ciblés. C'est pourquoi nous avons mis au point et validé une méthode de dosage du fipronil et des fiproles présentant aussi une activité toxicologique importante [5-7], dans les pollens, afin d'évaluer le potentiel de contamination des abeilles lors du butinage.

Les pollens des plantes étant les sources protéiques des ruches, si ceux-ci sont contaminés par les fiproles, on peut s'attendre à retrouver ces produits dans toute la ruche et peut-être même dans le miel par l'intermédiaire des abeilles. D'où l'intérêt de rechercher également les fiproles dans ces deux matrices.

Le but de cette étude est de détecter et quantifier le fipronil et les fiproles à l'état de traces dans plusieurs matrices complexes du monde apicole : les pollens, les abeilles et le miel. Les méthodes de dosage mises au point ont été validées pour remplir les critères de la directive 96/23/CE [8] et de la norme SANCO [9].

Matériel et méthodes

Les lots d'abeilles et de pollen (pelotes de pollens de trappe) sont préalablement broyés. L'extraction est réalisée sur 10 g de pollen ou 5 g d'abeilles (environ 50 abeilles) selon la procédure suivante (Figure 2) :

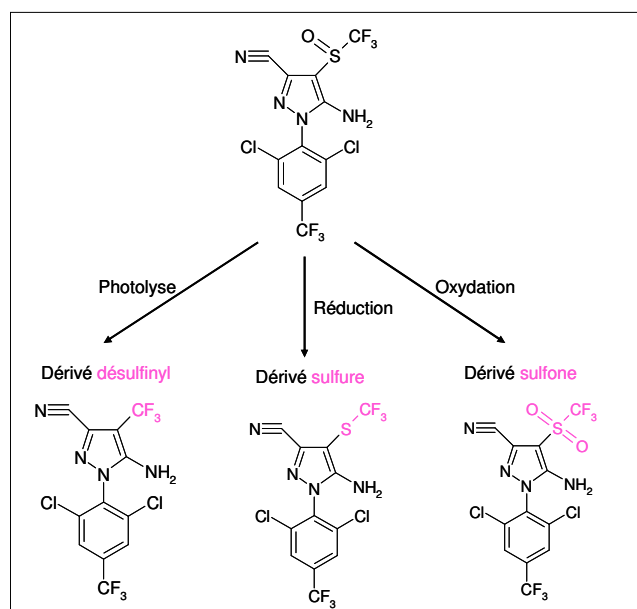


Figure 1 : Structure du fipronil et de ses principaux métabolites. Voies de dégradation du fipronil en fiproles.

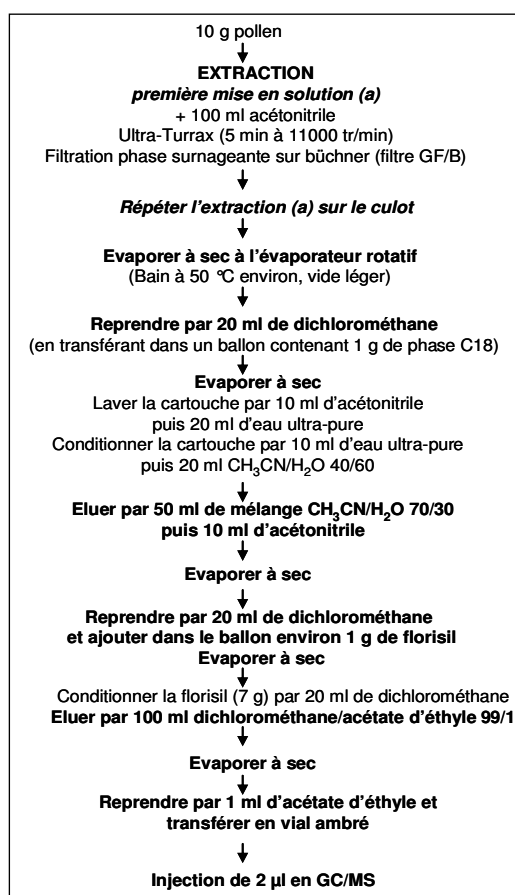


Figure 2 : Protocole d'extraction et purification employé dans cette étude

Pour la matrice miel, le protocole d'extraction/purification est simplifié puisque les 5 g de miel, préalablement dilués dans 15 mL d'eau ultrapure, sont déposés directement sur une cartouche Chem Elut (20 ml) couplée avec la phase florisil (7 g). Après 5 min, on élue par 4 fois 25 mL de CH₂Cl₂/acétate d'éthyle (99/1) goutte à goutte. Puis on évapore à sec (50° C sous vide), on reprend par 1 ml d'acétate d'éthyle avant d'injecter 2 µl en GC/MS.

L'analyse des fiproles sur pollen a été réalisée à l'aide d'un chromatographe Agilent Technologies 6890N associé à un détecteur de spectrométrie de masse 5973, en mode impact électronique (EI), et pour les matrices abeilles et miel associé à un détecteur de spectrométrie de masse 5975, plus récent, permettant de travailler en mode d'ionisation chimique négative.

Le gaz vecteur utilisé est l'hélium, la température de l'injecteur est maintenue à 250°C celles du détecteur de masse et du quadripôle sont à 150°C. L'énergie d'ionisation appliquée est de 70 eV en impact électronique et 180 eV en ionisation chimique. Les injections de 2 µL sont réalisées en mode *splitless* pulsé. Le débit de gaz vecteur est constant à 1 mL/min. Le gaz réactant utilisé pour l'ionisation chimique en mode négatif est le méthane (pureté 99,995 Messer France).

La programmation de température du four a été optimisée pour l'analyse : après un palier à 90°C (1 min), la température augmente à 25°C/min jusqu'à 200°C (1 min), puis à 3°C/min jusqu'à 245°C et enfin à 30°C/min jusqu'à 340°C (10 min). La colonne utilisée est une colonne DB-XLB 30 m × 0,25 mm ; 0,25 µm.

Les paramètres du spectromètre de masse et les ions fragments choisis (Tableau 1) pour la quantification en mode SIM ont été optimisés pour obtenir la sensibilité maximum des quatre composés.

Tableau 1 : Ions suivis pour les fiproles selon le mode d'ionisation employé

Mode d'ionisation	Impact Electronique	Ionisation Chimique Négative
Fipronil	369 – 367 – 351	368 – 366 – 331
Désulfinyl-fipronil	390 – 388 – 333	354 – 353 – 352
Sulfure-fipronil	420 – 353 – 351	386 – 385 – 384
Sulfone-fipronil	452 – 385 – 383	418 – 416 – 383

Résultats

Les méthodes mises au point ont été validées sur chaque matrice (linéarité, limite de détection, limite de quantification, spécificité, répétabilité, justesse) selon la directive 96/23/CE [3]. Les limites de détection et de quantification obtenues (Tableau 2) sont toujours inférieures au ng/g ce qui atteste de l'extrême sensibilité de la méthode.

Tableau 2 : Limites de détection (LD) et de quantification (LQ) validées sur les différentes matrices d'étude

	Quantité matrice (g)	LD (ng/g)	LQ (ng/g)
Pollen	10	0,07	0,20
Abeilles	5	0,02	0,10
Miel	5	0,10	0,20

Discussion

Chaque série analytique comprend, avec les échantillons inconnus, un « témoin » et un taux de récupération. Ces derniers sont utilisés pour valider les résultats de la série, le témoin devant être exempt de fiproles et le taux de récupération doit présenter un rendement compris entre 70 et 110 %.

Des tests préliminaires ont montré qu'un étalonnage en présence de matrice est nécessaire. L'échantillon témoin permet, en plus de contrôler l'absence de contamination durant les étapes d'extraction et purification, de réaliser cet étalonnage dans la matrice.

L'analyse d'échantillons inconnus de pollens a été menée sur 50 pollens de trappes à pollen sur cultures de tournesol et de maïs ainsi que sur 25 pollens de fleurs de tournesol et de maïs. Cet échantillonnage relativement important permet déjà de définir une tendance quant à la contamination des pollens. Les pollens issus de l'agriculture biologique sont exempts de fiproles. Les pollens issus de cultures traitées Régent TS présentent presque tous des signaux d'un ou plusieurs fiproles : 1/5 des pollens de fleurs sont positifs, 1/3 des pollens de trappe sur culture tournesol sont positifs et 2/3 des pollens de trappe sur culture maïs sont positifs. Le fipronil est le fiprole le plus souvent détecté (95 % des cas de détection positive) suivi du dérivé sulfone (53 %), du sulfure (24 %) et du désulfinyl (13 %). Ces résultats constituent une partie des données analytiques de l'étude globale du CNRS d'Orléans.

L'analyse a été également conduite sur 12 miels de tournesol, colza et toutes fleurs provenant de la société France Miel. Aucune fiprole n'a été détectée. Un miel acheté dans le commerce a été analysé et montre la présence de fipronil et de son dérivé sulfone, mais dans des teneurs inférieures à la limite de quantification.

La détection des fiproles dans les abeilles a été mise au point. Cependant elle n'a pas donné lieu à une étude particulière sur le terrain. Notons que le laboratoire est aujourd'hui prêt pour répondre à de telles demandes, émanant de pouvoirs publics ou d'organisations apicoles.

Conclusion

Nous avons mis au point un protocole d'extraction et de purification robuste et sélectif, permettant de détecter et quantifier, à des teneurs inférieures au ng/g, le fipronil et trois de ses principaux métabolites dans des matrices complexes telles que le pollen, les abeilles ou le miel. Aujourd'hui, à condition d'y mettre les moyens, les niveaux de sensibilité des méthodes analytiques peuvent être abaissés pour répondre aux questions cruciales qui se posent en terme d'exposition des pollinisateurs aux pesticides.

Références bibliographiques

1. Tingle C. C. D., et al. 2003., *Fipronil : Environmental fate, ecotoxicology and human health concerns*. Rev Environ Contam Toxicol. **176**, 1-66.
2. Colin M. E., et al., 2004. *A method to quantify and analyze the foraging activity of honey bees: Relevance to the sublethal effects induced by systemic insecticides*. Arch Environ Contam Toxicol. **47**, 387-395.
3. El Hassani A.K., et al., 2005. *Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (apis mellifera)*. Pharmacol Biochem Be. **82**, 30-39.
4. Mayer D. F. and Lunden J. D., 1999. *Field and laboratory tests of the effects of fipronil on adult female bees of apis mellifera, megachile rotundata and nomia melanderi*. J Apicult Res, **38**(3-4) 191-197.
5. Beeler A.B., Schlenk D.K., and Rimoldi J.M., 2001. *Synthesis of fipronil sulfide, an active metabolite, from the parent insecticide fipronil*. Tetrahedrons Lett., **42**, 5371-5372.
6. Hainzl D. and Casida J. E., 1996. *Fipronil insecticide: Novel photochemical desulfinylation*. P Natl Acad Sci USA, **93**(23) 12764-12767.
7. Hainzl D., Cole L. M., and Casida J. E., 1998. *Mechanisms for selective toxicity of fipronil insecticide and its sulfone metabolite and desulfinyl photoproduct*. Chem Res Toxicol, **11**(2) 1529-1535
8. Journal officiel des Communautés européennes, 1996. Directive 96/23/ce, Directive 96/23/ce, 1-4.
9. European Commission Directorate General Health and Consumer Protection. 2000. Guidance document on residue analytical methods, Sanco/825/00 rev.6, 1-16.